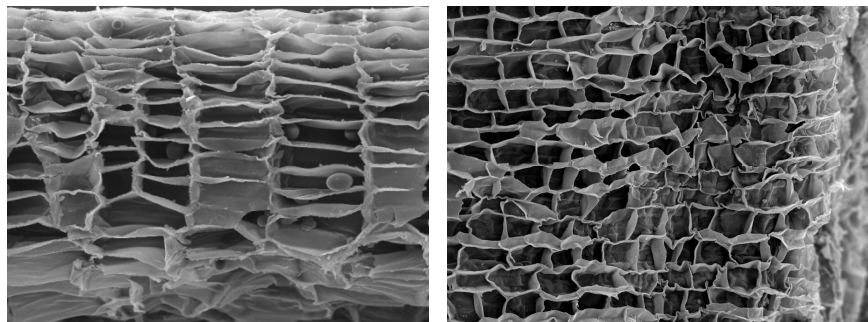




Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia**  
**Universidade Técnica de Lisboa**



## **Caracterização histológica e histoquímica das células suberosas em diferenciação das peridermes do sobreiro e da batata**

**Maria Sofia Quinha Cardoso**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais**

Orientador: Doutor José Afonso Rodrigues Graça

### **Júri:**

Presidente: Doutora Maria Helena Reis de Noronha Ribeiro de Almeida, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: - Doutora Maria Leonor Mota Morais Cecílio, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;  
- Doutor José Afonso Rodrigues Graça, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2011

## **Agradecimentos**

Os meus sinceros agradecimentos vão para:

- Doutora Teresa Quilhó e, Cristiana Alves pelo apoio prestado não só no laboratório de anatomia mas também fora dele;
- Doutor Hachemi Merouani, pela germinação das bolotas de sobreiro;
- Doutora Maria do Céu Silva e, Paula do Instituto de Investigação Científica Tropical de Oeiras, pela disponibilidade demonstrada e ajuda prestada no manuseamento do piramitome e realização de cortes histológicos;
- Engenheira Isabel Rodrigues do MicroLab – Instituto Superior Técnico, pelas bonitas fotografias obtidas através do microscópio electrónico de varrimento;
- Fundação João Lopes Fernandes, nas pessoas do seu Presidente da Administração, Engenheiro João Fernandes Lopes, e Engenheiro Pedro Pacheco Marques, pela disponibilização das árvores em exploração de cortiça e apoio na colheita das amostras;
- Professor Doutor José Graça por todos os ensinamentos, a orientação e a possibilidade de realização deste trabalho e,
- Todos aqueles sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

Este trabalho foi suportado em parte pelos Projectos financiados pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia:

- PTDC/AGR-GPL/101785/2008, “Genómica da formação da cortiça: um estudo integrado da qualidade da cortiça”;
- P-KBBE/AGR-GPL/0002/2009, “SUIT\_Engenharia da produção do biopoliéster suberina na batata para melhorar a tolerância ao stress”

e, integra-se nas actividades do Centro de Estudos Florestais.

## Resumo

Os objectivos deste trabalho foram estudar:

- (1) o processo de formação da felogene e da primeira periderme em caules jovens de sobreiro (*Quercus suber*);
- (2) o processo de formação da cortiça em árvores adultas em produção de cortiça amadia, incluindo o processo de suberificação das paredes celulares e,
- (3) a estrutura das paredes celulares suberificadas na periderme de batatas, incluindo uma variedade Desirée e três mutantes onde genes envolvidos na síntese da suberina foram silenciados.

Para este efeito foram utilizadas técnicas histológicas e histoquímicas, incluindo técnicas de luz transmitida, luz fluorescente e luz polarizada, assim como microscopia electrónica de varrimento (SEM).

Os principais resultados obtidos foram:

- a felogene no sobreiro forma-se ao fim de aproximadamente 1 mês de crescimento da planta;
- na cortiça amadia em formação são reconhecíveis três zonas: – uma em que as células estão em divisão; – uma outra com células cujas paredes se encontram em fase de espessamento e, – uma terceira zona onde as paredes já estão espessadas, mas as células ainda apresentam muito conteúdo citoplasmático e,
- o silenciamento dos genes envolvidos na ligação entre a parte aromática e alifática da suberina são os que provocam maior desarranjo na estrutura das paredes na periderme da batata.

**Palavras chave:** Sobreiro; cortiça; batata; periderme; processo de suberificação; paredes celulares suberificadas

## Abstract

This work had three main goals:

- (1) to study the process of the phellogen and first periderm formation in young plants of cork-oak (*Quercus suber*);
- (2) to study the process of cork-tissue formation in adult cork-oak trees under cork exploitation, including the suberification process of cork cell walls and,
- (3) to study the structure of suberized cell walls in the periderm of potatoes, including a wild-type and three mutatan, where genes involved in suberin synthesis were supressed.

To this end were used optical microscopy techniques, including bright field, epi-fluorescence and polarized light, together with scanning electron microscopy (SEM).

The main results were:

- the phellogen is formed in cork-oak before a month's life of the young plants;
- in the cork forming tissue three zones can be seen – the outer one, where cells are still dividing; – a middle one, were cork cell walls are thickening, and the inner one, contiguous to the mature cells, were cells still kept abundant cytoplasm material, although their cell walls already show their definitive thickness and,
- the silencing of the genes involved in the ester-linking between the aliphatic and aromatic domains of suberin have the higher effect in the disrupting of suberized cell walls in potato periderm.

**Key words:** Cork oak; cork; potato; periderm; suberification process; suberized cell walls

## Extended abstract

Cork production and transformation is very important in Portugal's economy. As a material, cork is also important, due to its large set of properties of technological interest.

However, our knowledge about cork-formation and the suberification process of cork cell walls are still very limited.

The periderm of potatoes, its “skin”, is also made up of suberized cork cells. Potato is one of the major agricultural crops in the world, and its periderm is fundamental for all aspects of potato conservation. Also, our knowledge about potato suberized cell walls is very limited.

In this work three main goals were pursued:

- (1) to study the process of the phellogen and first periderm formation in young plants of cork-oak (*Quercus suber*);
- (2) to study the process of cork-tissue formation in adult cork-oak trees under cork exploitation, including the suberification process of cork cell walls and,
- (3) to study the structure of suberized cell walls in the periderm of potatoes, including a wild-type and three mutants, where genes involved in suberin synthesis were suppressed.

The studies were carried out using histological and histochemical techniques.

The three types of plant materials were fixed in FAA, embedded in glycolmethacrylate resin, and sectioned with 2 µm of thickness. Several optical microscopy techniques were used, including bright field, epi-fluorescence and polarized light. Also superficial observations were made, together with cell wall thickness measurements, by scanning electron microscopy (SEM). For bright field and fluorescence observations the histological sections were stained or marked with fluorochromes, of general application or specific for the main cell wall constituents in case: suberin, lignin and other phenolics and polysaccharides.

The main results were:

- the phellogen is formed in cork-oak before a month's life of the young plants;
- in the cork forming tissue three zones can be seen: – the outer one, where cells are still dividing, – a middle one, where cork cell walls are thickening and, – the inner one, contiguous to the mature cells, where cells still kept abundant cytoplasm material, although their cell walls already show their definitive thickness and,
- the silencing of the genes involved in the ester-linking between the aliphatic and aromatic domains of suberin, namely *FHT#37*, have the higher effect in the disrupting of suberized cell walls in potato periderm.

## Índice

Lista de quadros	vii
Lista de figuras	viii
Lista de abreviaturas	x
1 Introdução	1
1.1 Objectivos	1
1.2 Enquadramento geral e importância do problema	1
1.3 Estado da arte	2
1.3.1 Estrutura histológica da periderme	2
<u>1.3.1.1 A periderme das plantas</u>	2
1.3.1.1.1 Felogene	3
1.3.1.1.2 Feloderme	5
1.3.1.1.3 Felema	6
<u>1.3.1.2 A periderme do sobreiro</u>	6
<u>1.3.1.3 A periderme da batata</u>	9
1.3.2 A estrutura celular da cortiça	10
<u>1.3.2.1 Estrutura da parede celular</u>	11
1.3.2.1.1 Estrutura da parede celular lenhificada	11
1.3.2.1.2 Estrutura da parede celular suberificada	13
1.3.2.1.3 Formação da parede celular: processo de suberificação	16
1.3.3 Técnicas histológicas e histoquímicas	17
<u>1.3.3.1 Técnicas de luz transmitida</u>	18
<u>1.3.3.2 Técnicas de fluorescência</u>	19
<u>1.3.3.3 Técnicas de luz polarizada</u>	20
1.3.4 Microscopia electrónica de varrimento (SEM)	22
2 Material e métodos	24
2.1 Caracterização do material	24
2.2 Inclusão em Polietilenoglicol (PEG 1500)	25
2.3 Inclusão em Technovit® 7100	26
2.4 Coloração e montagem dos cortes	28
2.5 Observações e fotografia	29
2.6 Microscopia electrónica de varrimento (FEG-SEM)	30
3 Resultados e discussão	31

3.1 Discussão das técnicas e marcadores histoquímicos utilizados	31
3.2 A formação da felogene e da cortiça em caules jovens de sobreiro	33
3.2.1 Estrutura anatómica geral dos caules jovens em desenvolvimento	33
3.2.2 A formação da primeira felogene em caules jovens de sobreiro	36
3.2.3 O processo de suberificação nas primeiras células de cortiça	37
3.3 A formação da cortiça amadia em árvores em exploração de cortiça	40
3.3.1 A localização do rasgamento de cortiça no momento da extracção	40
3.3.2 Processo geral de diferenciação das células de tecido suberoso	43
3.3.3 Formação da parede celular durante o processo de suberificação	43
3.4 As paredes celulares suberificadas na periderme da batata com os genes de suberina modificados	44
3.4.1 Estrutura da periderme da batata	44
3.4.2 As células suberificadas na periderme da batata de variedade Desirée	49
3.4.3 As células suberificadas na periderme das batatas com os genes da suberina modificados: <i>STKCS6#34</i> , <i>CYP86A33#3</i> e <i>FHT#37</i>	56
4 Conclusão	61
5 Referências bibliográficas	63

## **Lista de quadros**

Quadro 1 – Identificação dos tubérculos mutantes e correspondentes alterações induzidas	24
Quadro 2 – Corantes utilizados, preparação, metodologia e aplicação	27
Quadro 3 – Técnicas e marcadores histoquímicos utilizados, observações e resultados obtidos	32



## Lista de figuras

Figura 1 – Fase inicial do desenvolvimento da periderme do sabugueiro ( <i>Sambucus</i> ).	2
Figura 2 – A actividade da felogene: a formação da periderme.	4
Figuras 3 e 4 – Primeira divisão subepidérmica precursora da felogene e, iniciação da felogene e divisão da primeira célula felémica.	7
Figuras 5 e 6 – Formação da felogene e extensão a toda a camada subepidérmica.	8
Figura 7 – Periderme do sobreiro.	8
Figura 8 – Microfotografias, obtidas em microscópio electrónico de varrimento (SEM) da secção transversal e tangencial de uma amostra de cortiça amadia após cozedura em água a 100°C durante 1 hora.	10
Figura 9 – Estrutura e composição da parede celular das plantas.	12
Figura 10 – Camadas constituintes da parede celular das plantas.	12
Figura 11 – Estrutura da parede celular da cortiça segundo von Hohnel.	14
Figura 12 – Modelo de ultra-estrutura da parede celular da cortiça proposto por Sitte.	14
Figura 13 – Microfotografia da parede celular da cortiça em microscopia electrónica de transmissão.	15
Figura 14 – Microfotografias da parede celular da batata em microscopia electrónica de transmissão.	15
Figura 15 – Esquema da configuração do microscópio de fluorescência.	20
Figura 16 – Esquema da configuração do microscópio de luz polarizada.	21
Figura 17 – Curvas dos espectros de transmissão dos filtros utilizados.	29
Figura 18 – Estrutura anatómica geral dos caules jovens de sobreiro em três níveis de altura ao longo do caule. (Luz transmitida com Pironina Y)	34
Figura 19 – Formação da periderme em caules jovens de sobreiro. Níveis de altura do caule intermédio e inferior. (Luz transmitida com Pironina Y)	35
Figura 20 – Divisões celulares no processo de formação da periderme.	36
Figura 21 – Formação da primeira periderme em caules jovens de sobreiro. (Luz polarizada com Pironina Y e, luz fluorescente sem corante (“autofluorescência”))	38
Figura 22 – Nível de altura intermédio de caules jovens de sobreiro com formação da primeira periderme. (Luz transmitida com Sudão IV e luz fluorescente com Berberina/Cristal violeta)	39
Figura 23 – Pormenores das primeiras divisões da felogene e dos esclerócitos no nível de altura inferior de caules jovens de sobreiro. (Luz fluorescente e polarizada com Pironina Y e, luz transmitida com Berberina/Cristal violeta)	41

Figura 24 – Formação da cortiça amadia em árvores em exploração de cortiça: Células da cortiça em processo de diferenciação e células maduras. (Luz transmitida com Azul de toluidina O e Microscopia electrónica de varrimento)	42
Figura 25 – Formação da parede celular das células do tecido suberoso. (Luz transmitida com Azul de toluidina O e, luz fluorescente com Calcofluor)	45
Figura 26 – Células suberificadas em diferenciação e formação da parede celular. (Luz transmitida com Sudão IV e, luz polarizada com Berberina/Cristal violeta)	46
Figura 27 – Parede celular das células da zona de células em divisão e de células maduras. (Microscopia electrónica de varrimento)	47
Figura 28 – Células de cortiça em maturação das paredes celulares e células maduras. (Luz polarizada com Berberina/Cristal violeta e sem corante, luz fluorescente com Pironina Y e, luz transmitida com Azul de toluidina O)	48
Figura 29 – Estrutura geral da periderme da batata <i>STKCS6#34</i> . (Luz fluorescente com Berberina/Cristal violeta)	50
Figura 30 – Periderme da batata Desirée. (Luz transmitida com Azul de toluidina O e, luz fluorescente com Pironina Y)	51
Figura 31 – Periderme da batata Desirée. (Luz transmitida com Sudão IV, Luz polarizada com Berberina/Cristal violeta e, luz fluorescente sem corante (“autofluorescência”))	52
Figura 32 – Peridermes das batatas mutantes <i>STKCS6#34</i> , <i>CYP86A33#3</i> e, <i>FHT#37</i> . (Luz transmitida com Azul de toluidina O)	53
Figura 33 – Periderme das batatas mutantes <i>STKCS6#34</i> e <i>CYP86A33#3</i> . (Luz fluorescente sem corante (“autofluorescência”) e, com Calcofluor)	54
Figura 34 – Periderme das batatas. (Microscopia electrónica de varrimento - Desirée, <i>STKCS6#34</i> , <i>CYP86A33#3</i> e, <i>FHT#37</i> )	55
Figura 35 – Periderme das batatas mutantes <i>CYP86A33#3</i> e <i>FHT#37</i> . (Luz fluorescente com Calcofluor e sem corante (“autofluorescência”))	58
Figura 36 – Pormenor das paredes celulares da cortiça e batatas (Desirée, <i>STKCS6#34</i> , <i>CYP86A33#3</i> e, <i>FHT#37</i> ). (Luz transmitida com Azul de toluidina O)	59
Figura 37 – Paredes celulares do felema das batatas. (Microscopia electrónica de varrimento - Desirée, <i>STKCS6#34</i> , <i>CYP86A33#3</i> e, <i>FHT#37</i> )	60

## **Lista de abreviaturas**

BP – band-pass interference filters

FAA – Formalina acetato álcool

FEG – “field emission gun” de tungsténio

PEG – Polietileno-glicol

SEM – scanning electron microscopy (microscópio electrónico de varrimento)

TEM – transmission electron microscopy (microscopia electrónica de transmissão)

# 1 Introdução

## 1.1 Objectivos

Este trabalho tem como objectivos o estudo do desenvolvimento da primeira periderme no *Quercus suber*, a localização e identificação das células suberificadas em processo de diferenciação na periderme da batata e do sobreiro, através de técnicas histológicas e histoquímicas.

Assim, numa primeira fase foi utilizado o caule de uma planta jovem de sobreiro para análise da formação da primeira periderme, através da observação microscópica, seguindo-se a análise de amostras de cortiça, para a localização e identificação das células em processo de diferenciação e por fim a análise de amostras de batatas contendo casca numa tentativa de comparação com o ocorrido no tecido suberoso.

## 1.2 Enquadramento geral e importância do problema

Diversos autores descrevem o processo de formação da periderme bem como a sua localização e caracterização das células constituintes das peridermes da batata e do sobreiro no entanto, ainda pouco se sabe relativamente às células em processo de diferenciação nomeadamente no que diz respeito à forma como se dispõe a suberina nas paredes das células em maturação. A questão que se coloca é se a deposição de suberina nas células em diferenciação é um processo gradual ou imediato.

No caso do câmbio vascular, com actividade meristemática semelhante à da felogene, embora com localização diferente na planta, produzindo xilema e floema secundários, em direcção à medula e em direcção à periferia, respectivamente, Esau (1974), descreve que durante a maior actividade cambial a adição de novas células ocorre tão rapidamente que as mais velhas são ainda meristemáticas quando as novas lhe são adicionadas existindo uma acumulação de uma zona larga de células mais ou menos indiferenciadas. Fanh (1985) afirma que, quando o câmbio vascular está activo, o processo de divisão é mais rápido que o de diferenciação e que, por isso, a zona cambial é larga e, para começar a diferenciação estabelece-se um equilíbrio e a espessura desta zona permanece mais ou menos constante, estreitando quando o ritmo de divisão é reduzido e a diferenciação se faz mais rapidamente. Nesta zona de células mais ou menos indiferenciadas, apenas uma célula é a inicial, continuando a dividir-se periclinamente, produzindo derivadas sem que ela mesma se torne diferenciada em célula de xilema ou floema (Esau, 1974). O mesmo autor refere ainda que as iniciais são difíceis de distinguir das suas derivadas recentes já que estas também se

dividem periclinalmente uma ou mais vezes antes de começar a diferenciar-se em célula de xilema ou floema. E o que se passará na felogene? Será que as células derivadas da felogene se diferenciam e suberificam logo após a divisão da felogene?

Assim, e dada a sua importância os assuntos a abordar e a estudar neste trabalho, sobre os quais se sabe muito pouco são:

- o processo de formação da felogene, em geral nas plantas;
- o processo de formação da cortiça, em sobreiros adultos em produção de cortiça amadia (cortiça proveniente de partes de árvores nas quais é a terceira vez ou seguintes que se extrai cortiça);
- o processo de diferenciação celular e formação das paredes celulares suberificadas, tanto pela felogene original formada nos ramos jovens, como na formação da cortiça amadia pelas felogenes traumáticas e,
- a estrutura das paredes celulares suberificadas.

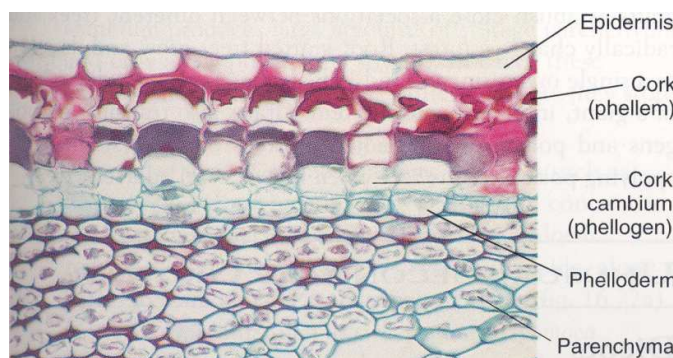
### 1.3 Estado da arte

#### 1.3.1 Estrutura histológica da periderme

##### 1.3.1.1 A periderme das plantas

A periderme desenvolve-se geralmente nas raízes e caules das plantas dicotiledóneas (Fortes et al., 2004) com crescimento secundário contínuo sendo um tecido protector que substitui a epiderme (Esau, 1974) que entretanto sofre rupturas devido às tensões provocadas pelo crescimento radial (Fahn, 1985). Do ponto de vista funcional é um tecido suberificado (Fahn, 1985) com funções de protecção e isolamento (Fortes et al., 2004).

Este tecido é subdividido em três sub-camadas: a felogene (felogénio ou câmbio cortical), o felema (também designado por súber ou cortiça) e, a feloderme (Figura 1).



**Figura 1 – Fase inicial do desenvolvimento da periderme do sabugueiro (*Sambucus*)**

(Fonte: Moore et al., 1995)

Na maior parte das dicotiledóneas e gimnospermas a primeira periderme formada desenvolve-se, regra geral, no primeiro ano de crescimento de um órgão axial, nas zonas onde tenha terminado o alongamento apical. A periderme formada nos órgãos jovens desenvolve-se ao mesmo tempo em toda a circunferência e forma um cilindro completo. Nos órgãos adultos este tecido normalmente desenvolve-se em zonas isoladas nas quais a actividade se estende lateralmente e podem passar vários anos até que o cilindro de felema se complete (Fahn, 1985).

A formação da periderme está também associada a falhas na epiderme e acções traumáticas (Esau, 1974 e, Fahn, 1985). Lev-Yadun e Aloni (1990) consideram a auxina e o etileno os principais factores que controlam a formação da periderme; segundo estes autores, grandes concentrações de auxinas promovem a produção do etileno, e, consequentemente accionam a formação da periderme.

Várias peridermes vão-se formando à medida que a árvore envelhece e cada vez mais profundamente no floema secundário. A porção de floema secundário que é isolada da restante pela formação da nova periderme acaba por morrer privada de água e nutrientes. As camadas de tecidos mortos isolados pela periderme juntamente com as camadas de periderme cuja actividade cessou, acumulam-se na superfície do caule, dando origem ao ritidoma. O modo de desenvolvimento da periderme na árvore, assim como a separação de tecidos mortos, determinam o tipo de ritidoma formado (Santos, 1998). O caso do sobreiro (*Quercus suber*) é excepcional no facto de, dada a longevidade da felogene, a casca exterior não ter inclusões de floema secundário, e ser portanto constituído apenas por tecido felémico (“cortiça”).

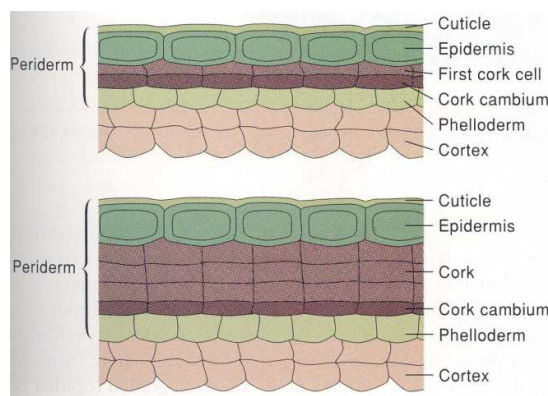
#### 1.3.1.1.1 Felogene

O local de origem da primeira felogene é variável, sendo no entanto mais comum a região cortical do caule (Santos, 1998). Brown et al. (1949) mostraram a formação da periderme na camada epidérmica em *Acer pennsylvanicum* L., no córtex de *Tília* sp., *Juglans* sp., *Platanus* sp., e no periciclo em *Thuja* sp. e *Juniperus* sp.. Fahn (1985) assinala em *Quercus suber* a formação da primeira felogene na epiderme, e posteriormente Graça e Pereira (1993, 2004) observaram na mesma espécie, o início da primeira felogene na camada sub-epidérmica. Esau (1953) descreve a origem da camada de felogene a partir de células da epiderme em *Nerium oleander*, *Pyrus*, de camadas corticais em *Robinia pseudoacacia*, *Pinus* e *Larix* e directamente no floema em *Cupressineae*, *Ericaceae*. Lev-Yadun e Aloni (1990) indicam para *Ficus elastica* e *Melia azedarach* a formação da felogene associada às lentículas.

Independentemente do local de início de formação da felogene esta é originada a partir de células em diferenciação que, aumentam os seus volumes citoplasmáticos, ao mesmo

tempo que, perdem além dos seus vacuolos centrais, com o começo das divisões, de forma gradual, caso existam, o amido e os taninos (Fahn, 1985). Tratando-se a felogene de um tecido meristemático secundário produz tecidos que formam parte da estrutura secundária da planta (Fahn, 1985). É constituído por uma única camada de células, todas do mesmo tipo (Esau, 1953, 1974 e, Fortes et al., 2004) que, na secção tangencial são poligonais, na secção transversal rectangulares e, achatadas na direcção radial (Fortes et al., 2004), embora para Esau (1953, 1974) estas células se apresentem rectangulares e achatadas radialmente formando uma camada tangencial contínua quando observada transversalmente e, longitudinalmente podem ser rectangulares ou um pouco irregulares na forma.

Tratando-se de um tecido meristemático a felogene actua do mesmo modo que o câmbio vascular (Chattaway, 1952 e 1953 in Santos, 1998) dividindo-se periclinalmente e/ou anticlinalmente, isto é, respectivamente, paralelamente à secção tangencial (aumentando o número de células na direcção radial) e/ou, perpendicularmente àquela superfície (aumentando o número de células no perímetro da felogene).



**Figura 2 – A actividade da felogene: a formação da periderme. (Fonte: Moore et al., 1995)**

Em consequência da primeira divisão periclininal, associada à formação da felogene, formam-se duas células semelhantes, a mais interior das quais se constitui como feloderme. A célula mais exterior sofre uma divisão periclininal resultando duas células filhas das quais, a mais externa se converte em célula de felema e a interna em célula da felogene continuando a dividir-se. Se a partir da primeira divisão se formam as células de felema e felogene, a feloderme não se forma (Fahn, 1985).

Portanto no processo de diferenciação celular e sendo as divisões periclininais as que se dão em maior número, as células filhas formadas para o interior vão constituir, a feloderme e, as formadas para o exterior, normalmente em número mais elevado, o felema (Figura 2).

Para acompanhar o engrossamento do caule as células de felogene sofrem também divisões anticlinais que permitem o aumento do número de fiadas radiais (Esau, 1953, 1974).

A felogene, tal como o câmbio vascular, apresenta uma periodicidade na sua actividade e repouso, não ocorrendo no entanto em paralelo (Santos, 1998). Fahn (1985) indica para *Robinia pseudoacacia* dois períodos de actividade da felogene durante um único período de actividade cambial e em *Acacia radiana* três períodos de actividade com intervalos de repouso durante um ano.

Na maioria das espécies, a felogene perde actividade e morre após algum tempo, formando-se uma nova felogene mais interiormente, que entra em actividade e vai constituir uma nova periderme sob a primeira. Deste modo formam-se sucessivas peridermes subjacentes à primeira, à medida que as sucessivas felogenes perdem actividade. O número de anos em que cada felogene está activa varia muito de espécie para espécie, desde um até vários, ou muitos anos. As novas peridermes que se formam podem apresentar-se, ou como um cilindro contínuo semelhante à primeira, ou sob a forma de escamas, como é o caso, por exemplo, no pinheiro (Fortes et al., 2004).

São vários os factores com influência na actividade da felogene. Por exemplo, em *Robinia pseudoacacia*, Fahn (1985) refere que a combinação de dia curto e temperatura elevada, assim como dia comprido e temperatura baixa, promovem o início da actividade. Para *Eucalyptus camaldulensis* verificou-se que humidade elevada e oxigénio abundante são indutores da iniciação precoce da felogene e que a iluminação não tem efeito na formação da periderme (Lipshitz e Waisel, 1970 in Santos, 1998).

#### 1.3.1.1.2 Feloderme

A feloderme é constituída por células vivas sem paredes suberificadas (Fahn, 1985). São células semelhantes às de parênquima cortical, podendo ser distinguidas destas pela sua posição na fila radial com as células de felema (Esau, 1974 e, Chan, 1986). Consideram-se como principais funções da feloderme o suporte mecânico, armazenamento, protecção (caso de cascas onde o felema é muito estreito, por exemplo em *Myrcia amazonea*, descrito por Roth (1981) in Santos (1998) ou onde houve remoção por intempérie) e ainda função fotossintética (Santos, 1998).

Em algumas plantas a feloderme não existe mesmo e, na maior parte dos casos é constituída por 2 a 3 camadas de células podendo chegar em alguns casos a 6, e alterar-se com a idade da planta. A camada de células de feloderme produzidas num único período de crescimento varia com a espécie e pode ser muito elevado (Fahn, 1985).



#### 1.3.1.1.3 *Felema*

O número de camadas de células de felema é, em geral, mais elevado que na feloderme. Em algumas plantas como por exemplo *Quercus suber*, acumulam-se camadas de células espessas de felema no exterior dos caules. A primeira periderme formada, que vai sendo substituída por peridermes mais internas, é relativamente fina e contém algumas camadas de células suberificadas (Fahn, 1985).

Segundo Fortes et al. (2004), o desenvolvimento das células de felema é semelhante ao das células vegetais em geral, conforme se encontra descrito mais à frente neste trabalho.

O felema é constituído por células citoplasmaticamente mortas (Esau, 1974 e, Fahn, 1985) que em secção tangencial são poligonais e em secção transversal aparecem achatadas radialmente, dispostas em filas radiais compactas e sem vazios intercelulares (Fortes et al., 2004). As células de felema caracterizam-se sobretudo pela suberificação da parede (Esau, 1974 e, Fahn, 1985) conferindo-lhes a função de protecção, evitando a perda de humidade do caule (Howard, 1977).

#### 1.3.1.2 A periderme do sobreiro

No sobreiro, na sua fase inicial de crescimento primário, e tal como nas outras espécies, o caule e os ramos são protegidos exteriormente pela epiderme, formada por uma única camada de células, revestidas por uma camada exterior de cutina (um polímero quimicamente semelhante à suberina), que desempenha funções de protecção dos tecidos celulares interiores, sendo todas as trocas gasosas asseguradas por estomas (Fortes et al., 2004).

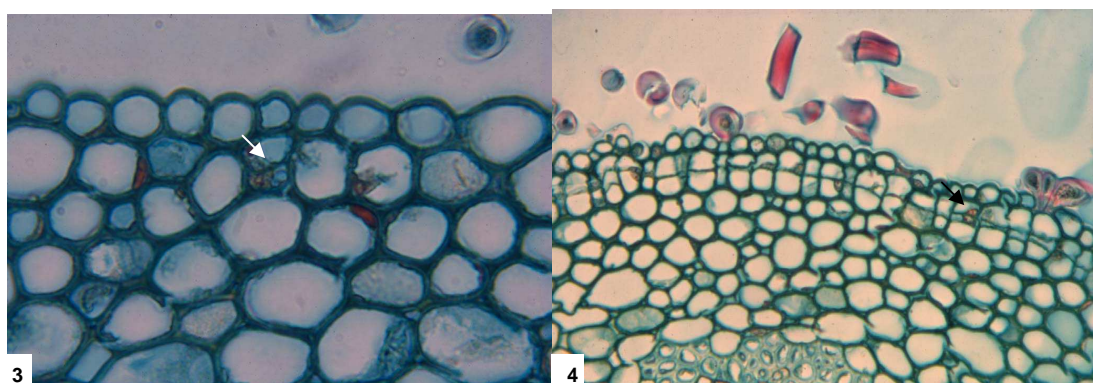
A epiderme que por sua vez não consegue acompanhar o crescimento em diâmetro do caule ou ramos, é substituída pela periderme nas suas funções de protecção, formando-se a felogene, meristema responsável pela produção da periderme, nos ramos de sobreiro normalmente durante o primeiro período anual de crescimento (Fahn, 1985, Graça e Pereira, 1993 e 2004, Fortes et al., 2004).

Graça e Pereira (1993, 2004) observaram que o desenvolvimento da primeira felogene nos ramos do sobreiro se deu na camada de células imediatamente abaixo da epiderme o que contradiz o observado por Fahn (1985), onde é afirmado que nesta espécie a primeira felogene se inicia na própria epiderme.

Conforme descrevem Graça e Pereira (1993, 2004), nas células tipo colênquima que formam o córtex exterior, na sua camada mais externa, a subepidérmica, começa por se observar o aumento em volume do núcleo, após o que se consuma a divisão deste e a formação da parede entre as duas células filhas (Figura 3) através da divisão periclinal. Embora se possa observar o aparecimento pontual destas primeiras divisões (Figura 3), elas

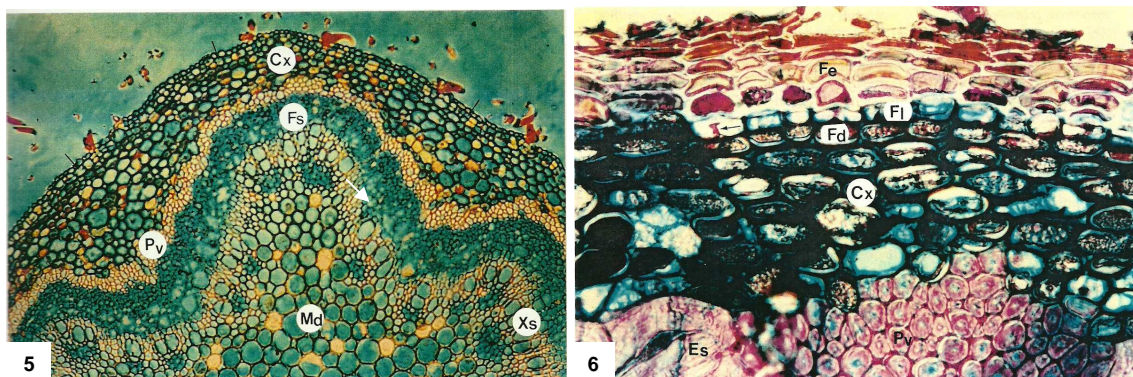
estendem-se rapidamente a toda a camada circular subepidérmica. É a célula mais exterior desta primeira divisão que se constitui como felogene, iniciando imediatamente uma nova divisão periclinal, formando a primeira fiada de células de felema ou súber propriamente ditas (Figuras 4 e 5). As células que se situaram internamente na divisão das células subepidérmicas, constituem-se como feloderme, assim normalmente se mantendo pelo menos durante o primeiro ano de crescimento (Figura 6). Com o aumento em diâmetro do caule, ainda no primeiro ano e seguintes, a felogene para manter a sua continuidade circular opera também divisões anticlinais, perpendiculares às periclinais com que origina o felema e a feloderme (Graça e Pereira, 1993, 2004).

A formação da cortiça não é mais do que a formação do felema resultante da actividade da felogene do sobreiro que, no primeiro ciclo vegetativo do ramo, produz apenas algumas assentadas de células.



**Figuras 3 e 4 – Primeira divisão subepidérmica precursora da felogene (seta branca) 682x (Figura 3) e, Iniciação da felogene e divisão da primeira célula felémica (seta preta) 275x (Figura 4). (Fonte: Graça e Pereira, 1993)**

Estas primeiras células de felema ou cortiça possuem uma forma semelhante às da felogene que as originou, apresentando-se achatadas radialmente e deformadas, com paredes onduladas, como resultado do obstáculo que a epiderme, ainda intacta nesta fase, opõe à sua expansão. Só nos anos seguintes, as células de cortiça atingem as suas dimensões “normais”, típicas dos tecidos mais velhos. À medida que se dá o crescimento em diâmetro do caule e ramos, a epiderme distende-se e, quando atinge o seu limite de resistência, fractura-se, mostrando as zonas subjacentes de cortiça já formadas, o que acontece no 3º ou 4º ano de vida dos ramos ou caules (Fortes et al., 2004).



**Figuras 5 e 6 – Formação da felogene e extensão a toda a camada subepidérmica (setas). (Cx – córtex; Pv – fibras perivasculares; Fs – floema secundário; Xs – xilema secundário e Md – medula. 70x (Figura 5) e Periderme de ramo com um ano de idade. Fe – felema; Fl – felogene com divisões anticlinais (seta); Fd – feloderme; Cx – córtex; Pv – fibras perivasculares e Es – esclerócito. 284x (Figura 6)) (Fonte: Graça e Pereira, 1993)**



**Figura 7 – Periderme do sobreiro (chaveta – felema ou cortiça). (Fonte: José Graça)**

Tal como nas outras espécies, também no sobreiro a felogene não é totalmente homogénea; em determinadas zonas, especialmente sob os estomas da epiderme, apresenta características especiais, constituindo a felogene lenticular que vai dar origem a células que se diferenciam como lentículas. Atribui-se às lentículas a função de permitir as trocas gasosas com o interior da árvore, através dos espaços intercelulares, funcionando como poros do tecido, e constituindo, portanto, um sistema com funções análogas às desempenhadas pelos estomas na epiderme (Fortes et al., 2004).

A felogene do sobreiro pode manter a sua actividade meristemática durante toda a vida da árvore, dividindo para o exterior assentadas contínuas de células suberificadas e, para o interior, mas em menor número, células de feloderme. Daqui resulta uma formação regular e contínua de cortiça, sem inclusão de outros tecidos, constituindo o cilindro exterior de revestimento do sobreiro, que pode atingir espessuras elevadas (Figura 7). Esta

característica distingue os sobreiros da maioria das plantas e permite uma formação contínua de cortiça ao longo dos anos (Fortes et al., 2004).

A actividade meristemática da felogene do sobreiro desenvolve-se, nas condições climáticas de Portugal, aproximadamente de Abril a Outubro/Novembro, interrompendo-se no Inverno (Fortes et al., 2004). Devido a este facto formam-se células com características distintas, ao nível da espessura das paredes celulares, na Primavera e no Outono, permitindo a sua distinção nos anéis de crescimento anual da cortiça em cortes transversais ou radiais.

As peridermes dos sobreiros, para além de não aparecerem intercaladas de tecidos madeirentos em que o floema é rico, como as células lenhificadas muito espessas das fibras floémicas e dos raios largos típicos dos *Quercus*, apresentam o felema na sua maior parte constituído por células suberificadas (Graça e Pereira, 1993, 2004) (Figura 7).

#### 1.3.1.3 A periderme da batata

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma planta perene da família das Solanáceas, originária da América do Sul cultivada em todo o mundo pelos seus tubérculos comestíveis. O número de variedades de batata é bastante considerável, conhecendo-se actualmente mais de 3000. As mais cultivadas da variedade de casca vermelha são: Asterix, Bartina, Desirée, Kondor, Rajá e Romano sendo todas elas híbridas (Wikipédia).

A periderme da batata é composta por uma camada de células especializadas, formadas a partir da felogene, e tem como principais funções evitar a perda de água e a entrada de agentes patogénicos, para as células parenquimatosas ou de armazenamento (Peterson et al., 1985 in Steven e Lulai, 1991).

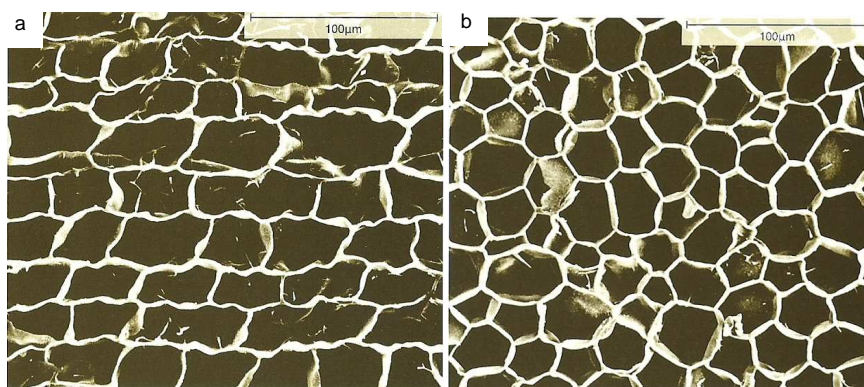
Em batatas ‘maduras’ a periderme é composta por 6-10 camadas de células com paredes suberificadas (Peterson et al., 1985 in Steven e Lulai, 1991). A suberina é um biopolímero presente em tecidos especializados das plantas, como é o caso da periderme, confinando-lhes protecção. É extremamente resistente ao ataque dos agentes patogénicos da batata uma vez que estes parecem ser incapazes de a degradar enzimaticamente (Kolattukudy e Soliday, 1985 in Steven e Lulai, 1991).

Permanece a confusão e incerteza quanto à fisiologia da periderme da batata (Lulai e Freeman, 2001). Reeve et al. (1969) indica que a periderme da batata é composta por felema (células suberificadas), felogene (câmbio cortical) e feloderme. No entanto vários são os autores que afirmam que o processo de suberificação ainda não está completamente caracterizado (Lulai e Freeman, 2001).



### 1.3.2 A estrutura celular da cortiça

A estrutura celular da cortiça tem sido normalmente estudada em cortiças de reprodução (cortiça extraída após tirada da cortiça virgem (cortiça virgem - cortiça proveniente do primeiro descortiçamento do tronco e dos ramos do sobreiro)), após cozedura, e é a ela que a próxima discussão é relativa. A cortiça de reprodução cozida é a base da transformação industrial da cortiça. As células da cortiça dispõem-se topo a topo em fiadas contínuas orientadas radialmente e, são caracterizadas por serem citoplasmaticamente mortas e por não possuírem espaços vazios entre si. Cada célula tem geralmente uma forma prismática, com 14 faces de contacto com as células vizinhas. Em cortes feitos radial e transversalmente, as células da cortiça apresentam-se praticamente iguais, como polígonos de 4 a 6 lados. Nestas duas secções também se observa que os topos das células, em fiadas diferentes, estão desencontrados. Em corte tangencial, as células exibem uma estrutura semelhante a um favo-de-mel, em que cada célula tem em geral 5 a 7 lados (Figura 8 b). Como se pode ver na Figura 8 a as paredes laterais estão frequentemente enrugadas devido à compressão a que as células estão sujeitas durante o crescimento em espessura (Natividade, 1938 e, Pereira et al., 1987).



**Figura 8 – Microfotografias, obtidas em microscópio electrónico de varrimento (SEM) da secção transversal (a) e tangencial (b) de uma amostra de cortiça amadia após cozedura em água a 100°C durante 1 hora. (Fonte: Fortes et al., 2004)**

O felema do sobreiro é, na totalidade ou em parte constituído por células suberificadas, com natureza e comportamentos muito diferentes das células lenhificadas, estas últimas constituindo a maioria das células que constituem os tecidos secundários das árvores. Sendo o felema um constituinte predominante dos tecidos mais exteriores dos troncos e ramos, desempenha funções de isolamento térmico e de impermeabilização, relativamente aos tecidos cambiais e vasculares que se lhe encontram subjacentes. Estas propriedades

decorrentes das células suberificadas que o incluem, são também as procuradas nas utilizações industriais da cortiça (Graça e Pereira, 1993).

Os tecidos formados maioritariamente por células suberificadas têm propriedades e comportamentos muito diferentes daqueles onde as células lenhificadas são dominantes, como consequência da natureza diferente das respectivas paredes celulares (Graça e Pereira, 1993).

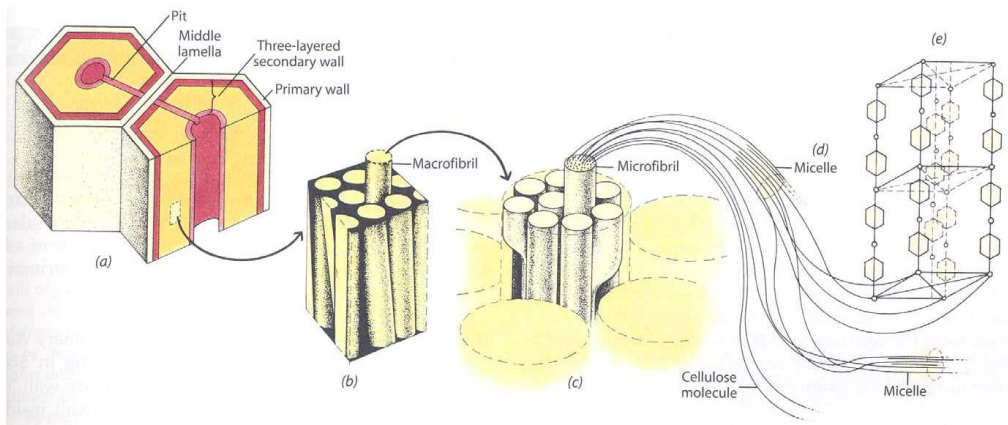
Por último, há que realçar mais uma vez, uma outra característica, e que é o facto de não existirem espaços entre as células (espaços intercelulares), ao contrário do que ocorre frequentemente noutros tecidos vegetais. As paredes de células adjacentes, incluindo especialmente os cantos das células, estão unidas através da lamela média, constituída maioritariamente por lenhina (Fortes et al., 2004).

#### 1.3.2.1 Estrutura da parede celular

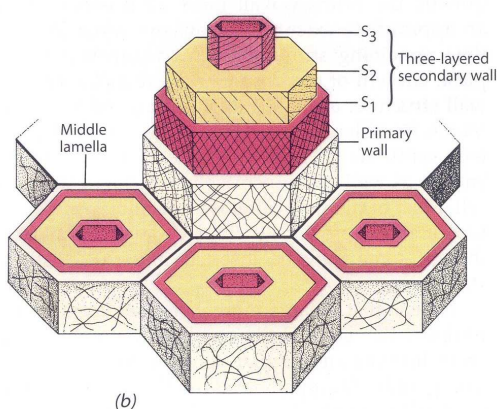
As paredes celulares servem de barreira física contra os organismos potencialmente patogénicos para a planta, determinam o tamanho e a forma das células, a textura dos tecidos bem como a forma final dos órgãos das plantas. Os tipos de células podem ser identificados pela estrutura das suas paredes celulares, reflectindo a relação próxima entre a estrutura da parede celular e a função das células (Evert, 2006). Nas plantas encontram-se dois tipos principais de paredes celulares com espessamento secundário: as paredes celulares lenhificadas e as paredes celulares suberificadas; as paredes celulares lenhificadas são típicas das fibras do xilema (madeira) e do floema e dos esclerócitos das plantas com crescimento secundário; as paredes celulares suberificadas são específicas do felema da periderme, a que se chama cortiça no caso das árvores.

##### 1.3.2.1.1 Estrutura da parede celular lenhificada

Os principais componentes estruturais das paredes celulares lenhificadas são a celulose e a lenhina. Os polímeros de celulose estão agrupados em feixes que são a base estrutural das microfibrilas, que por sua vez compõem as macrofibrilas visíveis ao microscópio óptico de luz transmitida (Figura 9). Nas microfibrilas os feixes de celulose estão envoltos numa matriz de moléculas de outros polissacáridos como hemiceluloses e pectinas bem como proteínas estruturais – glicoproteínas (Evert, 2006). A envolver as microfibrilas encontra-se a lenhina, que dá rigidez ao conjunto.



**Figura 9 – Estrutura e composição da parede celular das plantas. (Fonte: Raven et al., 1999)**



**Figura 10 – Camadas constituintes da parede celular das plantas. (Fonte: Raven et al., 1999)**

A parede celular das células lenhificadas é constituída por 3 camadas fundamentais: a substância intercelular ou lamela média, a parede primária e a parede secundária (Kerr e Bailey, 1934, Anderson, 1935, Bailey, 1938 e Kerr, 1946 in Esau, 1953) (Figuras 9 e 10), individualizadas com diferentes composições químicas e arranjos das suas microfibrilas (Fortes et al., 2004). As microfibrilas de celulose e outros polissacáridos constituem 20 a 30% do peso seco da parede primária e, 40 a 60% da parede secundária das células lenhificadas da madeira (Evert, 2006).

A lamela média, amorfa, coloidal e isotrópica, une as paredes primárias de 2 células contíguas sendo depositada sobre esta última camada a parede secundária seguida do

lúmen da célula. Nos tecidos de madeira a lamela média é comumente lenhificada e, a distinção entre esta e a parede primária é difícil durante o crescimento das células, tornando-se uma camada extremamente tênue, em células como traqueídeos e fibras, que desenvolvem proeminentes paredes secundárias (Esau, 1953).

A parede primária, opticamente anisotrópica (Esau, 1953), é na sua fase inicial constituída por celulose, compostos pectícos e quantidades variáveis de polissacáridos não celulósicos e hemiceluloses (Bonner, 1950 in Esau, 1953). Após o processo de deposição da lenhina, esta última torna-se no principal constituinte da parede primária (Esau, 1953).

Segundo Evert (2006) a parede primária difere da secundária por possuir um arranjo aleatório das microfibrilas (Figura 10). O mesmo autor refere ainda que em células de madeira com parede espessa, distinguem-se 3 camadas na parede secundária designadas de S1, S2 e S3, localizadas, respectivamente, fora, no meio e no interior do lúmen da célula (Figura 10), distinguindo-se também entre elas pela diferente orientação das suas microfibrilas (Frey-Wyssling, 1976) e, sendo a camada S2 a mais espessa e a S3 muito fina ou inexistente.

As paredes secundárias são fortemente anisotrópicas devido à sua composição ser maioritariamente celulose e polissacáridos não celulósicos como as hemiceluloses, podendo ser alterada através da deposição de lenhina e outras substâncias variadas (Esau, 1953).

#### *1.3.2.1.2 Estrutura da parede celular suberificada*

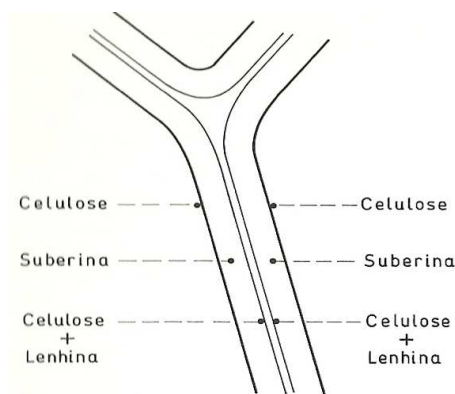
Não se conhece ainda com exactidão a ultra-estrutura das paredes celulares suberificadas, como são as da cortiça do sobreiro ou da periderme da batata, e vários modelos têm sido propostos tendo por base o que se sabe sobre a sua constituição química e o que é observável ao microscópio óptico e electrónico (Fortes et al. 2004).

Um dos primeiros modelos para a ultra-estrutura da parede celular da cortiça foi proposto por von Hohnel, em 1877, de acordo com o qual, a parede que separa duas células de cortiça adjacentes é constituída por cinco lamelas, sendo uma lamela comum às duas células, que o autor designou por 'lamela média', e considerou constituída por celulose fortemente lenhificada. Esta lamela média, forma uma rede contínua, sendo possível ir de um ponto situado na lamela média de uma dada célula para outro situado na lamela média de qualquer outra célula, sem que seja necessário sair das lamelas médias. De cada um dos lados da lamela média existe uma lamela de suberina, sendo a cavidade interior das células revestida por uma lamela constituída por celulose (Fortes et al., 2004) (Figura 11).

Mais tarde, em 1962, Sitte, mediante observações da cortiça utilizando microscopia electrónica de transmissão, propôs o modelo para a estrutura da parede celular esquematizado na Figura 12. Segundo este autor, cada 'meia-parede' é constituída por uma



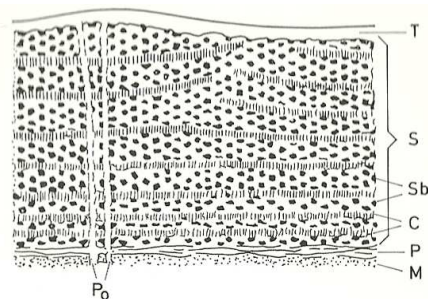
lamela média e uma parede primária, finas e lenhificadas, uma parede secundária constituída por camadas alternadas de suberina e ceras e uma parede terciária contendo lenhina e celulose. De acordo com o modelo proposto, a parede celular é atravessada por canais muito finos (canalículos) que se desenvolvem a partir dos plasmodesmos e se encontram cheios de material denso (Fortes et al., 2004).



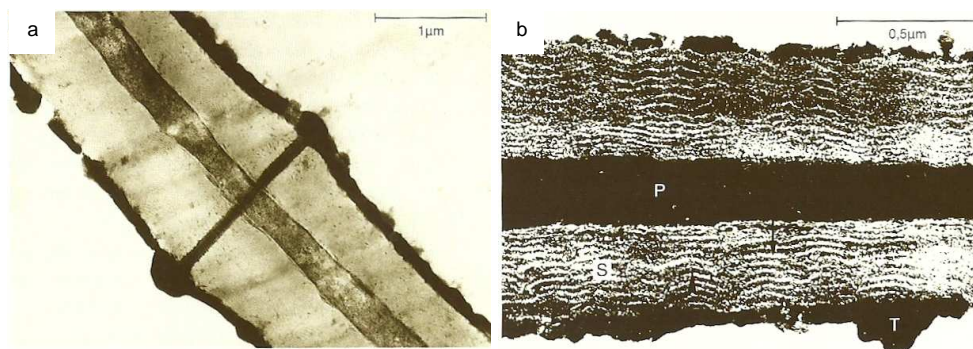
**Figura 11 – Estrutura da parede celular da cortiça segundo von Hohnel. (Fonte: Fortes et al., 2004)**

Honegger, num trabalho, publicado em 1968 refere que existe comunicação entre as células, assegurada pelos canalículos que não estão preenchidos por qualquer espécie de material e que não existe uma verdadeira parede terciária, sendo a superfície do lado interior da célula (lúmen) constituída por resíduos do protoplasma (Fortes et al., 2004).

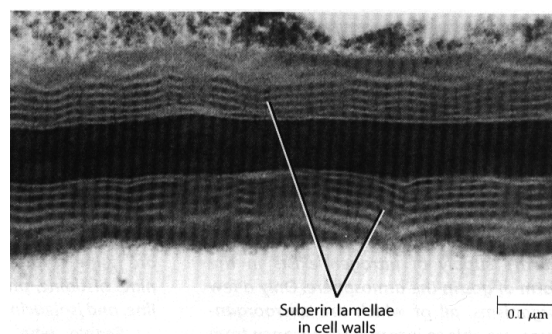
Mais recentemente, em 1988, Pereira, considera que a presença na cortiça de mais de 20% de lenhina não pode ser explicada sem que se admita que este componente também faça parte da parede secundária em resultado de estudos sobre a composição química da cortiça (Fortes et al., 2004).



**Figura 12 – Modelo de ultra-estrutura da parede celular da cortiça proposto por Sitte. (M – lamela média; C – ceras; Sb – suberina; Po – canalículos; P – parede primária; S – parede secundária e, T – parede terciária). (Fonte: Fortes et al., 2004)**



**Figura 13 – Microfotografia da parede celular da cortiça em microscopia electrónica de transmissão. Em (a) pode ver-se um canalículo que atravessa a parede celular e em (b) são visíveis as subcamadas da parede secundária. (Fonte: Fortes et al., 2004)**



**Figura 14 – Microfotografias da parede celular da batata em microscopia electrónica de transmissão. (Fonte: Raven et al., 1999)**

As Figuras 13 e 14, microfotografias obtidas em microscopia electrónica de transmissão, das paredes celulares da cortiça e batata, respectivamente, evidenciam a existência de lamelas na parede secundária (lamelas claras – ceras e lamelas escuras – suberina (Raven et al., 1999)) e uma estrutura do tipo canalículo que atravessa a parede celular da cortiça (Fortes et al., 2004).

Quimicamente as paredes das células suberificadas, são constituídas por uma base estrutural de suberina, cerca de 45% da massa seca, polifenóis tipo lenhina, 25%, com ceras triterpénicas e outros compostos extractáveis em elevada quantidade, 15%. Os polissacáridos, 15%, têm uma importância de cerca de ¼ daquela que possuem nas células lenhificadas, onde são o elemento estrutural básico. Nas células suberificadas esta função é desempenhada pela suberina, polímero de natureza lípidica-fenólica de estrutura molecular e supra-molecular ainda em boa parte desconhecidas (Graça e Pereira, 1993).

A suberina da parede celular é caracterizada pela presença de dois domínios poliméricos, uma polifenólica e outra polialifática (Bernards e Lewis, 1998; Bernards, 2002 in Evert, 2006). A cadeia polifenólica é incorporada com a parede primária formando ligações

covalentes com a cadeia polialifática depositada na camada interna da parede primária, entre a parede primária e a membrana plasmática, constituindo a parede secundária suberificada. Ao microscópio electrónico é visível na parede secundária uma estrutura lamelar ou em camadas, alternado bandas claras com escuras, que se pensa corresponderem predominantemente a zonas alifáticas e zonas ricas em fenóis, respectivamente, conforme tem sido proposto (Evert, 2006). Segundo Kolattukudy e Soliday (1985) in Evert (2006), no passado, e com base nos trabalhos de Sitte, as bandas claras foram consideradas compostas por ceras e as escuras por suberina. Contudo, esta ultra-estrutura lamelada das paredes celulares suberificadas da cortiça, nem sempre tem sido observada (Teixeira e Pereira, 2010).

Pelo que atrás ficou exposto, pode concluir-se que a estrutura da parede celular da cortiça do sobreiro e das células suberificadas em geral ainda hoje constitui assunto controverso, nomeadamente no que se refere à topoquímica (localização dos diversos componentes químicos na parede celular) e à existência de canaliculos na parede celular (Fortes et al., 2004).

A suberina, é portanto o maior componente da parede celular dos tecidos secundários protectores, como a cortiça ou felema, assegurando a redução da perda de água das partes aéreas da planta, e restringindo os movimentos apoplásticos da água e soluções formando uma barreira à penetração microbial (Evert, 2006).

#### *1.3.2.1.3 Formação da parede celular: processo de suberificação*

Pensa-se que, à semelhança do que se passa com outros tecidos, as células suberificadas recém-formadas incluem protoplasma (citoplasma e núcleo) que se encontra envolvido pela membrana celular, que as separa das células vizinhas, após a divisão da célula-mãe da felogene, podendo existir comunicação entre as células através de canaliculos que atravessam transversalmente a parede celular, designados por plasmodesmos. Estas novas células sofrem um processo de expansão na direcção radial, mantendo-se a sua largura na direcção tangencial praticamente igual à da célula-mãe da felogene. Após esta fase de crescimento, verifica-se um espessamento da membrana celular, que leva ao engrossamento da parede celular e à construção da parede celular. Este espessamento é feito pela deposição sobre a membrana celular de materiais biossintetizados pela célula formando camadas ou lamelas com diferentes estruturas e composições químicas, constituindo a parede celular (Fortes et al., 2004).

Nas paredes celulares lenhificadas, Esau (1953) descreve que a parede primária está associada a protoplastos vivos e Evert (2006) refere que esta é depositada antes e durante o crescimento da célula. As primeiras camadas celulósicas formadas são as que constituem

a parede primária que em alguns tipos de células são a única parede, como acontece com as células em processo activo de divisão e, as células maduras envolvidas nos processos de fotossíntese, secreção e armazenamento (Evert, 2006). Após a deposição da estrutura celulósica, dá-se a biossíntese do último constituinte estrutural da parede, a lenhina, que ocupa os vazios da estrutura, tanto na parede primária e secundária como nos espaços entre células - lamela média (Fortes et al., 2004).

Relativamente ao processo de formação das paredes celulares suberificadas as informações disponíveis são escassas. Segundo (Esau, 1974; De Bary, 1884 e, Sifton, 1945) a suberificação das células de felema começa antes destas atingirem o seu tamanho máximo. Terminada a sua diferenciação e na fase final dá-se a morte das células, com a secagem do líquido citoplasmático e deposição dos resíduos do citoplasma na face interior das paredes celulares, ficando o interior das mesmas, os lúmens, vazios (Graça e Pereira, 1993) e apenas ocupados por um gás, que se especula ser ar (Fortes et al., 2004). Com a suberificação, as células tornam-se praticamente impermeáveis, envolvendo no seu interior a mistura gasosa cuja composição ainda não foi determinada (Fortes et al., 2004).

### **1.3.3 Técnicas histológicas e histoquímicas**

Determinados aspectos das células vivas podem ser estudados directamente através da utilização de um microscópio óptico de luz transmitida. Contudo em trabalhos que requeiram obter informação química e estrutural é necessário 'estabilizar' as células ou tecidos celulares antes da sua análise, o que pode ser conseguido através do congelamento dos tecidos ou através de tratamentos químicos que actuam sobre os componentes dos tecidos, particularmente sobre as proteínas, os quais são designados por "fixação". A fixação permite a preservação das células e da sua estrutura morfológica, podendo para tal ser utilizados diferentes agentes fixadores como por exemplo o FAA, que tem por base o álcool etílico, o ácido acético e o formaldeído (Lyon, 1991).

Após o processo de estabilização/imobilização dos tecidos, estes devem ser desidratados, sendo a água substituída por uma substância, o meio de inclusão, que penetra nos tecidos na fase líquida, tornando-se depois num sólido (Lyon, 1991) Desta forma os tecidos ficam impregnados numa substância dura, que poderá ser Polietilenoglicol, Parafina, Plásticos acrílicos (Metacrilato) ou Plásticos epóxicos, de dureza crescente nesta listagem. Quanto mais duro o meio de inclusão, mais finos são possíveis os cortes histológicos, diminuindo respectivamente a sua espessura dos 10 µm até 1µm.

Os órgão ou tecidos, mesmo quando cortados em pedaços de reduzidas dimensões, não são suficientemente transparentes para ser observáveis, pelo que é necessário cortá-los com espessuras o mais finas possível, tornando-os transparentes aos fotões. A operação de

corte é efectuada com um micrótomo ou piramitome, que poderá utilizar facas de aço ou vidro, consoante a dureza do meio de inclusão utilizado e as espessuras de cortes pretendidas. Os cortes depois de obtidos deverão ser colocados em lâminas de vidro para observação microscópica.

Para que a maioria dos tecidos sejam visíveis ao microscópio de luz visível, recorre-se à utilização de corantes específicos, para os componentes das suas estruturas ou, para as inclusões celulares de natureza química diversa. São muitos os corantes disponíveis consoante o que se pretende observar e o tipo de luz utilizado no microscópio.

Depois da coloração os cortes são montados entre lâmina e lamela de vidro colocando-se entre os dois, sobre o material a observar, uma resina solidificável com um índice de refração semelhante ao vidro, que para além de aumentar a transparência dos cortes também os conserva (por exemplo, o bálsamo-do-canadá, Entelan, Eukit, etc).

Sendo os objectivos deste trabalho a localização e identificação das células suberificadas em processo de diferenciação na periderme do sobreiro e da batata, bem como, a sua caracterização histológica e histoquímica, três tipos principais de constituintes químicos das paredes celulares vão estar em causa: suberina, lenhina e polissacáridos. Há que ter em atenção que a suberina é estruturalmente semelhante à cutina presente na parte exterior das células da epiderme. A suberina e a cutina diferem contudo na sua deposição nas células, enquanto que a cutina se deposita fora da parede celular das células da epiderme na camada superficial de todas as plantas terrestres, a suberina deposita-se no interior das paredes celulares suberificadas das peridermes (Krishnamurthy, 1999).

#### 1.3.3.1 Técnicas de luz transmitida

A microscopia de luz transmitida pressupõe a preparação do material conforme descrito anteriormente e a utilização de corantes adequados ao que se pretende observar tendo em conta o meio de inclusão adoptado. Neste caso o contraste da imagem resulta da diferença de reflectividade da luz nas diversas regiões da amostra, uma vez que o sistema é constituído basicamente pela fonte de iluminação e um sistema de lentes.

Alguns métodos de microscopia de luz transmitida que poderão ser utilizadas para a identificação/localização da suberina e cutina são:

- Coloração com o Sudão;
- Cloriodeto de zinco-potassa cáustica;
- Azure B;
- Hipoclorito de Potássio-Cianina;
- Violeta de Genciana;
- Azul de toluidina O e,

- Sulfato de Nilo Azul (Krishnamurthy, 1999).

Alguns destes corantes também podem ser utilizados como marcadores das paredes celulares em geral, para além das paredes celulares suberificadas.

### 1.3.3.2 Técnicas de fluorescência

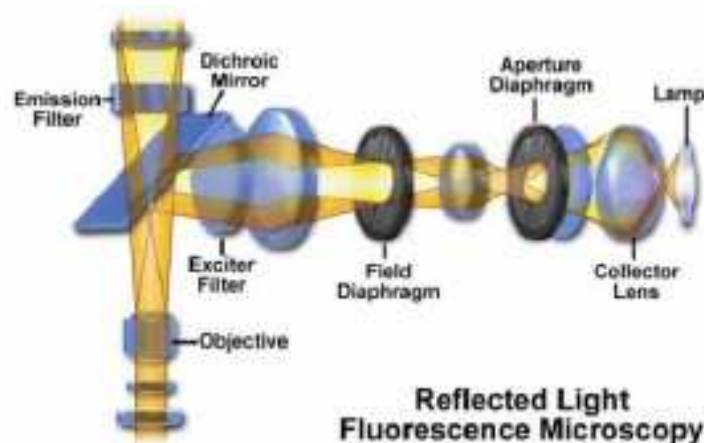
Na microscopia de fluorescência utiliza-se tipicamente uma fonte de luz de mercúrio de alta pressão que excita os fluorocromos no nosso tecido com luz de vários comprimentos de onda, até à gama do ultra violeta. Neste último caso pode-se beneficiar do seu menor comprimento de onda e maior energia, do que a luz visível utilizada na microscopia de luz transmitida, permitindo uma melhor resolução.

A fluorescência é a propriedade de algumas substâncias para, após serem excitadas com radiação de baixo comprimento de onda, emitirem radiação de maior comprimento de onda (Marchi e de Castro, 2005 e, Lacey, 1989). Algumas substâncias absorvem a energia da radiação ultravioleta emitindo depois radiação dentro do espectro de luz visível. Microorganismos corados por um corante fluorescente aparecem como objectos luminosos quando observados com luz ultravioleta (Marchi e de Castro, 2005).

O corante fluorescente é chamado de fluorocromo, sendo capaz de emitir luz visível após excitação adequada (Lodish et al., 2003 in Marchi e de Castro, 2005). Um exemplo de fluorocromo é o Laranja de acridina que se liga aos ácidos nucleicos conferindo uma fluorescência amarelo esverdeada ao DNA e avermelhada ao RNA (Taboga (sem data) in Marchi e de Castro (2005)). Os fluorocromos podem combinar-se com os componentes das paredes celulares, tornando-as fluorescentes e, passíveis de identificação e localização (Melo, 2002 in Marchi e de Castro 2005).

A janela de excitação é seleccionada com filtros que devem ser cuidadosamente escolhidos consoante a aplicação que se pretende. A escolha dos filtros depende das características do fluorocromo utilizado bem como da fonte de luz envolvida. O filtro é utilizado para seleccionar uma determinada parte do espectro de excitação ou emissão (Lacey, 1989). Há vários tipos de filtros disponíveis, entre os quais os filtros de interferência (BP, “band-pass interference filters”) (Lacey, 1989) (Figura 15).

Os filtros BP são os mais utilizados como filtros de excitação, especialmente quando são utilizadas lâmpadas de mercúrio como fonte de luz já que têm altas transmissões (90%) (Lacey, 1989).



**Figura 15 – Esquema da configuração do microscópio de fluorescência.**

(Fonte: Davidson e Abramowitz, 1999)

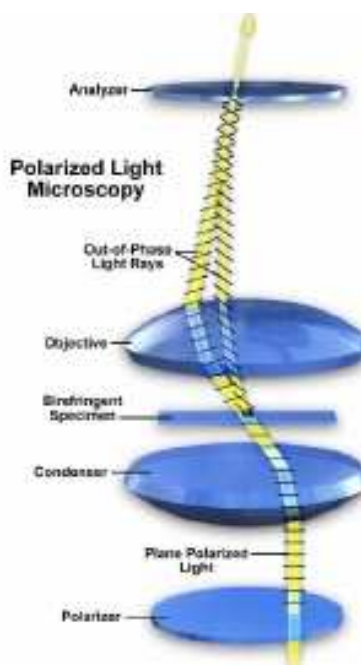
Alguns dos componentes dos tecidos quando não corados têm algum grau de fluorescência ao que se chama autofluorescência ou fluorescência primária. Esta fluorescência é particularmente pronunciada em algumas paredes celulares das plantas. Existem compostos que por si só não são fluorescentes mas que com certos tratamentos, nomeadamente adição de fluorocromos, podem transformar-se em produtos fluorescentes (Lyon, 1991). Entre os compostos naturalmente fluorescentes, estão a clorofila, e a lenhina ou outros compostos fenólicos das paredes celulares (Taboga (sem data) in Marchi e de Castro (2005)).

Estão descritos vários métodos de coloração utilizados em microscopia de fluorescência para identificação/localização da suberina e cutina, como sejam: Método da Auramina O; Método da 3,4-Benzopireno-Cafeína; Método de Tratamento da Clorofila; Método do Tampão fosfato; Método da Phosphina 3R e, Método “Scarlet” H (Krishnamurthy, 1999).

#### 1.3.3.3 Técnicas de luz polarizada

Na microscopia de luz polarizada o microscópio apresenta duas lentes ou filtros, chamados de polarizador e analisador. Estes filtros posicionam-se entre a fonte de luz e o condensador (filtro polarizador) e entre a objectiva e a ocular (filtro analisador) (Figura 16). Os filtros polarizadores e analisadores apenas deixam passar a luz num plano de direcção de vibração das ondas luminosas, conhecido por plano da luz polarizada (PPL). Quando o filtro polarizador e analisador estão cruzados a 180°, a chamada posição de extinção, não há passagem de luz e o campo fica completamente escuro. Se no tecido em observação, colocado entre o polarizador e o analisador, existirem estruturas moleculares ordenadas ou

cristalinas, estas viram o plano da luz polarizada num ângulo definido. Virando a posição do analisador para esse ângulo, há passagem de luz e essa parte do tecido torna-se brilhante e visível. Os componentes moleculares com estrutura cristalina orientada (anisotrópica) apresentam um comportamento bi-refringente em relação à luz polarizada, promovendo um realce destes materiais em detrimento a outros não bi-refringentes (isotrópicos) (Taboga (sem data) in Marchi e de Castro (2005)). Nalguns casos, podem existir nos tecidos, não estruturas cristalinas moleculares, mas arranjos supramoleculares orientados, como lamelas ou cilindros, dando origem à chamada bi-refringência de forma. Estas últimas estruturas também são observáveis por luz polarizada (Frey-Wyssling, 1976).



**Figura 16 – Esquema da configuração do microscópio de luz polarizada.**

(Fonte: Davidson e Abramowitz, 1999)

Os materiais biológicos mais estudados na microscopia de polarização são as células musculares estriadas, paredes celulares celulósicas, amido, colágenos e DNA. A utilização de corantes pode aumentar a bi-refringência dos tecidos (Taboga (sem data) in Marchi e de Castro (2005)).

Através da microscopia de luz polarizada, a parede celular lenhificada secundária pode ser contrastada da seguinte forma: a lamela média é isotrópica, a parede primária é fracamente bi-refringente, as camadas S1 e S3 são muito brilhantes e, a camada S2 é escura (Krishnamurthy, 1999). Estas diferenças são possíveis devido às diferentes orientações das microfibrilas, constituídas majoritariamente por celulose cristalina, que constituem as diferentes camadas da parede celular (Krishnamurthy, 1999).



A suberina é tida como não bi-refringente e isotrópica, enquanto que a absorção de UV e a autofluorescência são fortes (Krishnamurthy, 1999).

#### **1.3.4 Microscopia electrónica de varrimento (SEM)**

Na microscopia electrónica de varrimento, conhecidas pelas iniciais inglesas SEM, scanning electron microscopy, a característica que a distingue da microscopia óptica, é que na primeira a análise da amostra é feita utilizando um feixe de electrões. A grande vantagem de utilização de um microscópio electrónico de varrimento em relação ao microscópio óptico é sua alta resolução, na ordem de 2 a 5 nm, actualmente existem instrumentos que vão até 1 nm, enquanto que no óptico é de 0,5  $\mu$ m. A microscopia SEM permite a observação por reflexão das superfícies.

Para observação de estruturas biológicas através do microscópio electrónico de varrimento os procedimentos técnicos que garantem um contraste, conservação e resistência do material à passagem dos electrões e ao vácuo obrigam, tal como na microscopia óptica, à fixação e à desidratação do material, passando depois por uma fase de secagem que pode ser efectuada de várias maneiras, sendo mais comum a remoção da água com álcool ou acetona, sem que haja deformação das células, e por fim a cobertura da superfície a observar com um bom condutor eléctrico, normalmente ouro, permitindo assim o varrimento da amostra com o feixe de electrões.

Estes microscópios utilizam feixes de electrões acelerados com altas energias. A fonte emissora do feixe de electrões mais comum é o filamento de tungsténio, mas existem outras fontes como o Hexaboreto de lantânio ( $\text{LaB}_6$ ) e o “field emission gun” de tungsténio (FEG) que apresentam brilho mais intenso. O FEG-SEM é uma técnica mais cara, mas tem um tempo de vida superior e sobretudo uma maior estabilidade ao nível do feixe de electrões.

O feixe de electrões ao incidir no objecto colocado na sua trajectória vai originar vários fenómenos resultantes da interacção dos electrões com os átomos que compõem o objecto, resultando principalmente a emissão de electrões com energia igual (retro difundidos) ou inferior (secundários) à energia dos electrões incidentes, em fotões de alta energia (Raios X) e fotões na banda do visível (catodoluminescência). Estas radiações quando captadas correctamente fornecem informações características sobre a amostra tais como, por exemplo, topografia da superfície, composição, cristalografia, etc.

Os sinais emitidos pela amostra com maior interesse para a formação da imagem são os electrões secundários e os retro difundidos. À medida que o feixe de electrões primários vai varrendo a amostra, estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os electrões secundários fornecem informação ao nível da topografia da

superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retro difundidos fornecem imagem característica de variação da composição.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Caracterização do material

**Plantas jovens de sobreiro.** Para o estudo da formação da primeira periderme do sobreiro foram postas a germinar bolotas de sobreiro, provenientes da Herdade do Olival em Estremoz. As bolotas foram colocadas a germinar em 1 de Março de 2011, e foram recolhidas amostras de caules jovens em vários estádios de desenvolvimento.

**Cortiça amadia em formação.** Para o estudo do processo de diferenciação da cortiça em árvores em produção de cortiça amadia e, do processo de suberificação nas paredes celulares, amostras de cortiça foram recolhidas de seis árvores em exploração comercial de cortiça. A amostragem foi realizada na Herdade dos Leitões (Ponte de Sôr, Portalegre) no âmbito do Projecto “Genómica da formação da cortiça: um estudo integrado da qualidade da cortiça” (Projecto FCT PTDC/AGR-GPL/101785/2008). A colheita das amostras foi realizada em 4 de Junho de 2010.

As árvores foram seleccionadas após extracção de pequenas amostras de cortiça (“calas”) e observação visual da sua qualidade. Imediatamente após a extracção das pranchas de cortiça, fragmentos de aproximadamente 20 mm de comprimento por 10 mm de largura, foram cortados da parte interna (“barriga”) e colocados/fixados no líquido fixador, Formalina Acetato Álcool (FAA) (Ácido acético: 1 parte; Formaldeído 37%: 2 partes; Etanol: 10 partes e, H<sub>2</sub>O: 7 partes) para preservar a estrutura e composição dos tecidos.

**Peridermes de batata da variedade Desirée e modificadas geneticamente.** As amostras de tubérculos de batata da variedade Desirée e as modificadas geneticamente com supressão de genes presumivelmente envolvidos na biossíntese da suberina (identificados como *STKCS6#34*, *CYP86A33#3* e *FHT#37*) foram fornecidos por Solana Research GmbH, no âmbito do Projecto “Engineer SUberin biopolyester production in potato to Improve stress Tolerance (SUIT)” (Projecto FCT P-KBBE/AGR-GPL/0002/2009). As alterações genéticas induzidas nos tubérculos são as apresentadas no Quadro 1.

**Quadro 1 – Identificação dos tubérculos mutantes e correspondentes alterações induzidas**

Mutantes	Alterações genéticas induzidas
<i>STKCS6#34</i>	Plantas em que se diminuiu a actividade do gene <i>STKCS6#34</i> que codifica uma elongase dos ácidos gordos. Esta enzima catalisa o alongamento da cadeia hidrocarbonada para comprimentos inferiores a 26 carbonos.
<i>CYP86A33#3</i>	Plantas em que se diminuiu a actividade do gene <i>CYP86A33#3</i> que codifica uma omega-hidroxilase. Esta enzima catalisa a omega-hidroxilação dos ácidos gordos em C16 e C18, dois dos principais omega-hidroxiácidos da suberina
<i>FHT#37</i>	Plantas em que se diminuiu a actividade do gene <i>FHT#37</i> que codifica uma transferase feruloílo-ácidos gordos hidroxilados. Esta enzima catalisa a ligação éster entre os omega-hidroxiácidos e o ácido ferúlico.

Estas batatas foram criadas em estufas, tendo sido removidas da terra ao fim de 14 dias, pelo que o processo de suberificação das células da periderme, se encontra presumivelmente concluído. As amostras das peridermes das batatas foram recolhidas cortando pequenos fragmentos dos tubérculos, incluindo a sua “pele”, a periderme. Estas amostras foram imediatamente fixadas em FAA.

## **2.2 Inclusão em Polietilenoglicol (PEG 1500)**

Das plantas jovens de sobreiro foram recolhidas diversas amostras representativas das diferentes alturas ao longo do caule das plantas que foram colocadas em FAA para fixação. Estas amostras com cerca de 1 a 2 mm de espessura foram depois hidratadas numa solução de iguais partes de etanol a 20% e água destilada durante cerca de 2 horas passando depois apenas para água destilada por outras 2 horas. Posteriormente foram incluídas em Polietilenoglicol 1500 (PEG).

Para a inclusão das amostras de caules de sobreiros jovens, foi colocado o material a incluir num copo de plástico devidamente identificado ao qual se juntou uma solução de 20 ml de PEG puro, marcando com caneta de acetato o nível deste no copo, e adicionados 80 ml de água destilada. As amostras nesta solução de PEG foram colocadas na estufa a 60° para evaporar a água, durante 2 a 3 dias, sendo verificado diariamente o nível até se atingir os 20 ml iniciais de PEG puro. Após a evaporação da água destilada o PEG inicial foi substituído por PEG puro, previamente fundido a 60°, sendo colocado o copo de plástico novamente na estufa à mesma temperatura durante 24 horas. Depois de retirado da estufa o copo de plástico contendo a amostra, orientou-se o provete da forma mais conveniente ao corte e deixou-se solidificar o PEG.

**Corte no micrótom.** As amostras de caules de plantas de sobreiro incluídas em PEG foram cortadas com facas de aço utilizando-se para tal um micrótom deslizante [Leica SM 2400] sendo a espessura dos cortes de 10 µm. Esta operação é delicada e exige facas perfeitamente afiadas (usou-se um afiador automático da marca Leica SP9000).

Para a realização destes cortes na espessura desejada foi utilizada a “técnica da fita-cola” que envolve a utilização de uma fita especial, Tesa Film106, para auxílio do corte no micrótom. A fita foi previamente colada na superfície da amostra a cortar, ficando o corte seccionado agarrado a esta. Os cortes obtidos, colados na fita-cola, foram postos com a ajuda de uma pinça, virados para cima, sobre uma placa de petri, passando-se em seguida à coloração. Esta técnica permite mais facilmente o manuseamento do material, impedindo a sua desagregação durante o processo de coloração e montagem de lâminas.

## 2.3 Inclusão em Technovit® 7100

Das amostras de cortiça e de batata previamente fixadas em FAA, foram retiradas pequenas amostras, com uma lâmina de barbear, cada uma com 3x2x1 mm (comprimento, largura e espessura) que, foram desidratadas sucessivamente em etanol a 70% e 96%, durante 2 horas cada, e em etanol 100%, durante 1 hora, após o que foram incluídas em resina Technovit® 7100 (Heraeus Kulzer). Esta resina é um polímero plástico de glicol-metacrilato. Foram também incluídas nesta resina amostras dos caules de sobreiros jovens com 1 a 2 mm de espessura, para obtenção de cortes semi-finos.

A inclusão nesta resina envolveu as seguintes etapas sequenciais:

1. Fixação - consistiu na fixação das amostras em FAA;
2. Desidratação - as amostras foram desidratadas gradualmente com etanol a 70%, durante 2 horas à temperatura ambiente, depois com etanol a 96% durante outras 2 horas e, por fim durante 1 hora em etanol a 100% à temperatura ambiente;
3. Pré-infiltração - após preparação da solução de pré-infiltração (partes iguais de etanol 100%, com o líquido base de Technovit® 7100), as amostras foram colocadas nesta solução, à temperatura ambiente, até afundarem, sendo utilizado vácuo para facilitar a penetração da solução (durante 10 minutos);
4. Infiltração - tendo afundado na solução de pré-infiltração as amostras foram colocadas na solução de infiltração (1 g de endurecedor em 100 ml de líquido base de Technovit® 7100 mexendo no mínimo durante 10 minutos, com o auxílio de um agitador magnético), e colocadas novamente sob vácuo até afundarem;
5. Inclusão - Preparou-se a solução de inclusão (1 ml de endurecedor com 15 ml da solução usada para a infiltração das amostras mexendo bem durante 1 minuto) e colocou-se uma pequena quantidade, com uma pipeta de plástico, desta última no molde de teflon e com o auxílio de uma pinça colocou-se e orientou-se a amostra no interior do molde já com a solução, retirando-se depois o excesso de solução com papel. Ficando esta etapa concluída em aproximadamente 2 horas à temperatura ambiente e,
6. Montagem - retira-se a amostra, já incluída na resina, do molde. Nesta etapa utiliza-se Technovit® 3040 que é uma cola para ligar a amostra incluída ao porta-amostra. Para preparação da cola misturou-se, num vidro de relógio, 2 partes de pó com 1 parte de líquido para obter uma mistura viscosa, mexendo com o auxílio de uma espátula de metal. Depois de preparada a cola colocou-se um pouco desta no espaço deixado nos moldes contendo as amostras incluídas com cerca de 2 mm de espessura e colocou-se o suporte por cima do molde preenchendo o espaço do suporte com um pouco desta cola também. Após aproximadamente 10 minutos pôde

**Quadro 2 – Corantes utilizados, preparação, metodologia e aplicação**

<b>Corante</b>	<b>Preparação</b>	<b>Método de aplicação</b>	<b>Aplicação</b>
Berberina/Cristal violeta	0,1 g Berberine hemisulfate + 100 ml H <sub>2</sub> O destilada 0,5 g Crystal Violet + 100 ml H <sub>2</sub> O destilada	Aplicar o corante berberina sobre o corte durante 15 min; aplicar de seguida o cristal violeta durante 1 min; lavar com H <sub>2</sub> O destilada até sair água sem corante; levar à estufa a 60° até secar; montar.	Microscopia de luz transmitida, fluorescente e polarizada
Calcofluor	10 mg Calcofluor + 90 ml de H <sub>2</sub> O destilada + 10 ml de solução tampão Tris/HCl (1M, pH 9)	Aplicar o corante sobre o corte durante 2 min; lavar com H <sub>2</sub> O destilada e montar.	Microscopia de luz fluorescente
Acridina laranja	0,1 g Acridine Orange + 100 ml H <sub>2</sub> O destilada	Aplicar o corante sobre o corte durante 5 min; lavar com H <sub>2</sub> O destilada até sair água sem corante; levar à estufa a 60° até secar; montar.	Microscopia de luz fluorescente
Pironina Y	0,5 g Pyronin Y + 100 ml de H <sub>2</sub> O destilada. Depois de preparado o corante foi decantado com 7,5 ml de clorofórmio.	Aplicar o corante sobre o corte durante 5 min; lavar com H <sub>2</sub> O destilada até sair água sem corante; levar à estufa a 60° até secar; montar.	Microscopia de luz transmitida, fluorescente e polarizada
Sudão IV	0,5 g Sudan IV + 100 ml etanol 70%	Aplicar o corante sobre o corte durante 20 min; lavar com cuidado e rapidamente com etanol 50%; levar à estufa a 60° até secar; montar.	Microscopia de luz transmitida
Azul de toluidina O	0,25 g Toluidinblau O + 250 ml H <sub>2</sub> O destilada + 0,25 g Sodium tetraborate-10-hydrate	Aplicar o corante sobre o corte durante 5 min; lavar com H <sub>2</sub> O destilada até sair água sem corante; levar à estufa a 60° até secar; montar.	Microscopia de luz transmitida

retirar-se a amostra incluída do molde estando pronta para cortar no micrótomos ou piramitome.

**Corte no “Piramitome”.** As amostras de caules de sobreiros jovens, cortiça e batata incluídas em Technovit® 7100 foram cortadas com facas de vidro, feitas num “knifemaker” [marca LKB modelo Bromma 7800], utilizando um Piramitome LKB Bromma 11800 para a realização de cortes semi-finos com 2 µm de espessura. Depois de obtidos estes cortes foram colocados com uma pinça sobre uma lâmina de vidro contendo uma gota de água destilada sendo depois secos sobre uma placa de aquecimento [CAMAG] a 60°C durante 10-15 minutos para adesão à lâmina e posteriormente corados.

## 2.4 Coloração e montagem dos cortes

Embora existam diferentes métodos de coloração, a utilizar em microscopia óptica, para a identificação/localização da suberina e dos constituintes das paredes celulares e tendo em conta os objectivos deste trabalho e os tecidos em estudo foram escolhidos alguns métodos que nos pareceram mais apropriados tendo em conta a bibliografia consultada e a experiência adquirida.

Os cortes de caules de plantas de sobreiro incluídos em PEG obtidos a partir do uso da técnica da fita-cola, após secagem ao ar foram corados com a “coloração tripla” Crisoidina G/Pironina Y/“Astra blau” e com Azul de toluidina O.

**Colorações utilizadas nos cortes em PEG.** Para a coloração tripla os cortes foram primeiramente corados com a Crisoidina G e Pironina Y durante 5 minutos, sendo em seguida lavados com água destilada e depois corados com o Astra blau durante 1 minuto e passados novamente por água destilada para remoção do excedente de corante. Na coloração com Azul de toluidina O os cortes foram imersos neste corante durante 5 minutos e depois lavados em água destilada. Os cortes depois de corados e aderentes à fita-adesiva e sempre virados para cima foram então colocados numa caixa de Petri e deixados a secar durante 24 horas.

Depois de bem secos os cortes foram montados em lâminas onde se fez previamente um esfregaço com “Gelatina Keiser”. Fizeram-se grupos de 10 lâminas separadas por pedaços de papel de seda que foram prensadas durante 48 horas, para que houvesse uma boa aderência ao corte, ainda com a fita. Findo esse período de tempo as lâminas foram colocadas em xilol durante 30 minutos para remoção da fita-cola e em seguida em álcool a 96% durante 30 minutos tendo-se procedido então à montagem dos cortes com Eukit.

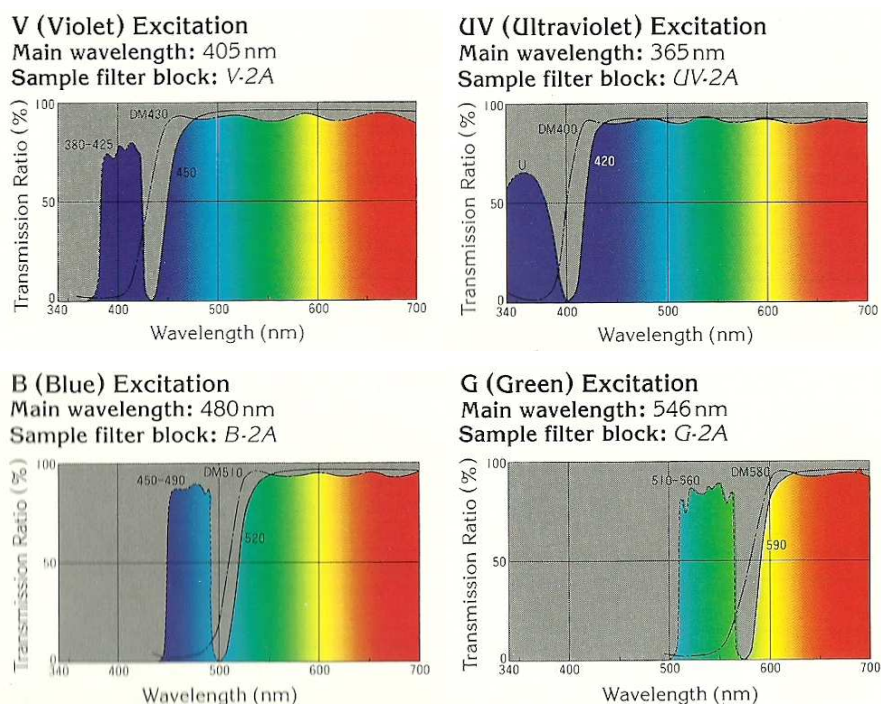
**Colorações utilizadas nos cortes na resina Technovit.** Os cortes obtidos das amostras de caules de sobreiros jovens, cortiça e batata incluídos em Technovit® 7100, foram corados

com Acridina Laranja, Sudão IV, Azul de Toluidina O, Pironina Y, Calcofluor e, com a coloração dupla de Berberina/Cristal violeta (Steven e Lulai, 1991). Os procedimentos e utilização para as diferentes colorações são os apresentados no Quadro 2 tendo sido utilizado como meio de montagem o Eukit com exceção para os cortes corados com Sudão IV e Calcofluor nos quais se utilizou, respectivamente, a Glicerina e H<sub>2</sub>O destilada.

## 2.5 Observações e fotografia

As observações e microfotografias foram realizadas num microscópio óptico Nikon Microphot-FXA, equipado com sistemas independentes para luz transmitida, fluorescente e polarizada.

Os filtros utilizados na microscopia de fluorescência foram V (violeta), UV (ultra-violeta), B2 (“blue”) e G (“green”) cujas curvas dos espectros de transmissão são apresentadas na Figura 17.



**Figura 17 – Curvas dos espectros de transmissão dos filtros utilizados. (Nikon, 1989)**

Foram utilizadas objectivas planoapocromáticas (luz transmitida) e apocromáticas de 10 a 100x (luz polarizada), oculares para observação de 10x e ocular fotográfica de 2.5x.



As imagens foram registadas em dois tipos de filmes:

- Para as observações em luz fluorescente e luz polarizada, foram utilizados negativos de média resolução e alta sensibilidade - Kodak Portra, de 400 e 800 ASA, assim como diapositivos de alta-sensibilidade - Fujichrome Provia 400X e,
- Para as observações em luz transmitida foram utilizados filmes de diapositivos rápidos e de grão fino - Fujichrome Provia 100F.

## **2.6 Microscopia electrónica de varrimento (FEG-SEM)**

As amostras de batata e cortiça para observação em microscópio electrónico de varrimento (SEM), com cerca de 3x1x1 mm e 5x4x3 mm (comprimento, largura e espessura), respectivamente, depois de fixadas em FAA, foram submetidas a desidratação gradual em etanol a 70%, 96% e 100% durante 24 horas cada, sendo secas numa estufa de vácuo durante 48 horas. Depois de secas, a superfície das amostras foram banhadas com ouro.

Para as observações em microscopia electrónica de varrimento foi utilizado um microscópio electrónico de varrimento de alta resolução JEOL JSM7001F com fonte de emissão de electrões FEG [MicroLab, Instituto Superior Técnico, Lisboa].

Através do software ligado ao microscópio foram feitas medições da espessura das paredes celulares das amostras de cortiça e batata.

### 3 Resultados e discussão

A apresentação e discussão dos resultados estão estruturadas da seguinte forma:

1. Discussão das técnicas histológicas e histoquímicas utilizadas como corantes gerais dos tecidos, ou como marcadores específicos dos constituintes das paredes celulares, nomeadamente da suberina (ponto 3.1);
2. Discussão do processo de formação da felogene e da suberificação das primeiras células de felema, "cortiça", formadas em plantas jovens em início de crescimento (ponto 3.2);
3. Discussão do processo de formação da cortiça nas árvores em produção activa de cortiça amadia, incluindo o processo de diferenciação celular e formação da parede celular suberificada (ponto 3.3) e,
4. Discussão da estrutura da periderme da batata e, das paredes celulares suberificadas que a constituem, em quatro casos, um relativo à batata de variedade Desirée, e três outros relativos a batatas que foram modificadas geneticamente, por supressão de alguns dos genes presumivelmente envolvidos na síntese da suberina (ponto 3.4).

Apesar de terem sido realizados cortes de caules de sobreiros jovens incluídos em PEG e respectivas colorações, apresentam-se aqui apenas os resultados obtidos dos cortes de caules de um sobreiro jovem, de uma das amostras de cortiça e de 4 amostras de batata incluídos em Technovit® 7100, bem como os resultados obtidos da preparação de amostras de cortiça e batata para utilização em microscopia electrónica de varrimento.

#### 3.1 Discussão das técnicas e marcadores histoquímicos utilizados

As principais técnicas histológicas e histoquímicas de microscopia óptica que foram utilizadas neste trabalho estão sumarizadas no Quadro 3. Foram utilizados três tipos de microscopia óptica: luz polarizada, luz fluorescente e luz transmitida.

A luz polarizada, para a qual não é necessária a utilização de corantes, é utilizada para detectar a presença de estruturas moleculares cristalinas e/ou supramoleculares ordenadas. Na posição de extinção (quando o polarizador e analisador estão cruzados a 180°) só há passagem de luz se existirem na parede celular estruturas ordenadas que desviem a luz num plano perpendicular ao do polarizador. Neste trabalho foi possível mostrar que a suberina (e também a cutina) apresentam pelo menos bi-refringência de forma, prova da existência de estruturas supramoleculares organizadas nas paredes celulares suberificadas e cutinizadas.

**Quadro 3 – Técnicas e marcadores histoquímicos utilizados, observações e resultados obtidos**

<b>Técnica</b>	<b>Observação histológica/histoquímica</b>	<b>Resultado observado em</b>
Luz polarizada	Brilho (luz) visível de estruturas moleculares ou supramoleculares organizadas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suberina</li> <li>• Polissacáridos</li> </ul>
<p><b>Luz fluorescente</b></p> <p>Autofluorescência B2: excitação pela luz azul 480 nm</p> <p>Pironina Y B2: excitação pela luz azul 480 nm G: excitação pela luz verde 546 nm</p> <p>Acridina laranja G: excitação pela luz verde 546 nm</p> <p>Berberina/Cristal violeta B2: excitação pela luz azul 480 nm</p> <p>Calcofluor B2: excitação pela luz azul 480 nm</p>	<p>Fluorescência de compostos aromáticos</p> <p>Corante geral; paredes celulares avermelhadas e paredes lenhificadas amareladas/esbranquiçadas e suberificadas brancas</p> <p>Corante geral; paredes celulares alaranjadas</p> <p>Paredes suberificadas e lenhificadas amarelo/esbranquiçadas</p> <p>Paredes celulósicas azuis; paredes suberificadas e cutina brancas e paredes lenhificadas azul mais claro</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aromáticos associados à suberina</li> <li>• Lenhina</li> <li>• Suberina e cutina</li> <li>• Lenhina</li> <li>• Todo o tipo de compostos</li> <li>• Suberina e cutina</li> <li>• Lenhina</li> <li>• Celulose (Polissacáridos)</li> </ul>
<p><b>Luz transmitida</b></p> <p>Pironina Y</p> <p>Azul de toluidina O</p> <p>Sudão IV</p> <p>Berberina/Cristal violeta</p>	<p>Corante geral, paredes celulares laranja/avermelhadas</p> <p>Corante geral, paredes lenhificadas e/ou suberificadas azul esverdeadas e paredes celulósicas arroxeadas</p> <p>Paredes suberificadas e cutina alaranjadas</p> <p>Berberina: Paredes lenhificadas e/ou suberificadas amareladas ou esbranquiçadas Cristal violeta: Paredes lenhificadas e cutinizadas arroxeadas</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Todo o tipo de compostos</li> <li>• Suberina</li> <li>• Outros compostos da parede</li> <li>• Suberina e cutina</li> <li>• Suberina e cutina</li> </ul>

Na luz fluorescente, foram utilizados corantes que, consoante os filtros utilizados, vão reagir com os componentes ou estruturas que absorvem a radiação seleccionada, emitindo radiação dentro do espectro de luz visível. Às estruturas que, sem qualquer corante, após absorção de radiação de excitação, emitem luz visível chamam-se autofluorescentes.

A luz transmitida pressupõe a utilização de corantes que reagem com os componentes das paredes celulares permitindo a detecção de estruturas específicas determinadas pelo corante.

### **3.2 A formação da felogene e da cortiça em caules jovens de sobreiro**

Dos caules de um sobreiro jovem foram seleccionados 3 níveis de altura: superior, intermédio e inferior (Figura 18). No nível de altura superior, mais próximo do ápice da planta, o diâmetro é de aproximadamente 1 mm e distancia-se da base do caule em cerca de 28,5 cm. Os outros dois níveis de altura: intermédio e inferior, mais próximos da base da planta, a cerca de 14,3 e 0,3 cm de altura, respectivamente, apresentam-se com diâmetros aproximados de 1,2 e 2 mm.

As amostras de caules foram cortadas e fixados com FAA, 49 dias após germinação.

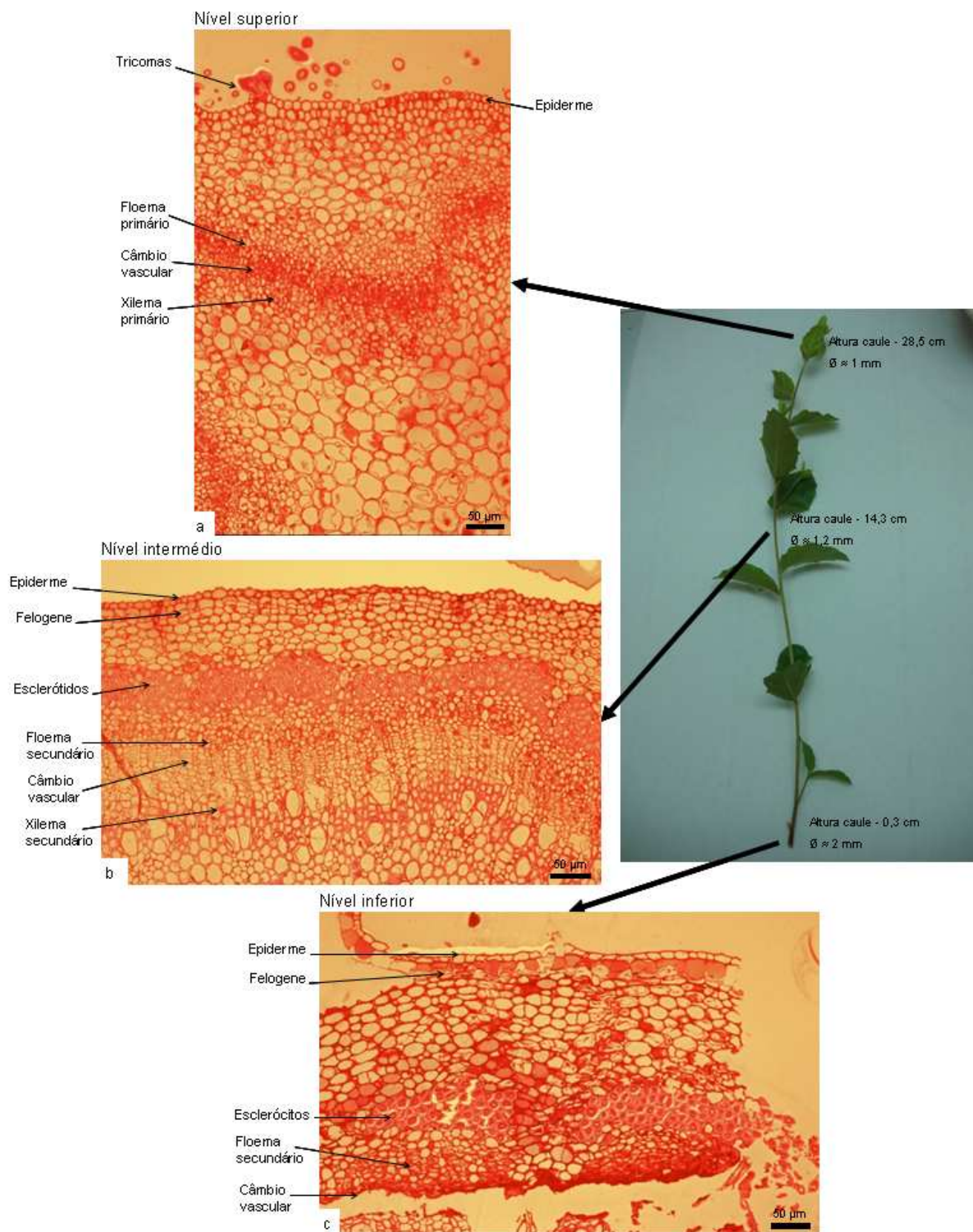
Depois de incluídos em Technovit® 7100 foram realizados cortes histológicos semi-finos com 2 µm de espessura, num piramitome, que foram corados com Pironina Y, Berberina/Cristal violeta, Sudão IV, Calcofluor e Acridina laranja.

Os cortes depois de corados foram observados em microscopia de luz transmitida, fluorescente e polarizada tendo sido também observados cortes não corados.

#### **3.2.1 Estrutura anatómica geral dos caules jovens em desenvolvimento**

No nível de altura superior, correspondente à zona do caule mais próxima do ápice e menos diferenciada, identificam-se, da periferia para o centro, os seguintes tecidos primários: epiderme, com muitos tricomas (“pelos”), córtex primário, feixes vasculares primários, e o início da formação e actividade de tecidos secundários como o câmbio vascular e medula (Figura 18 a).

No nível intermédio, com tecidos mais diferenciados que o anterior, os tecidos secundários já estão em desenvolvimento. Assim identificam-se da periferia para a medula: epiderme, periderme incluindo o felema, a felogene e a feloderme, córtex primário com esclerócitos (de re-diferenciação de células de parênquima cortical primário), floema secundário, câmbio vascular e xilema secundário e, córtex primário na medula (Figura 18 b).



**Figura 18 – Estrutura anatómica geral dos caules jovens de sobreiro em três níveis de altura ao longo do caule. (Luz transmitida com Pironina Y)**



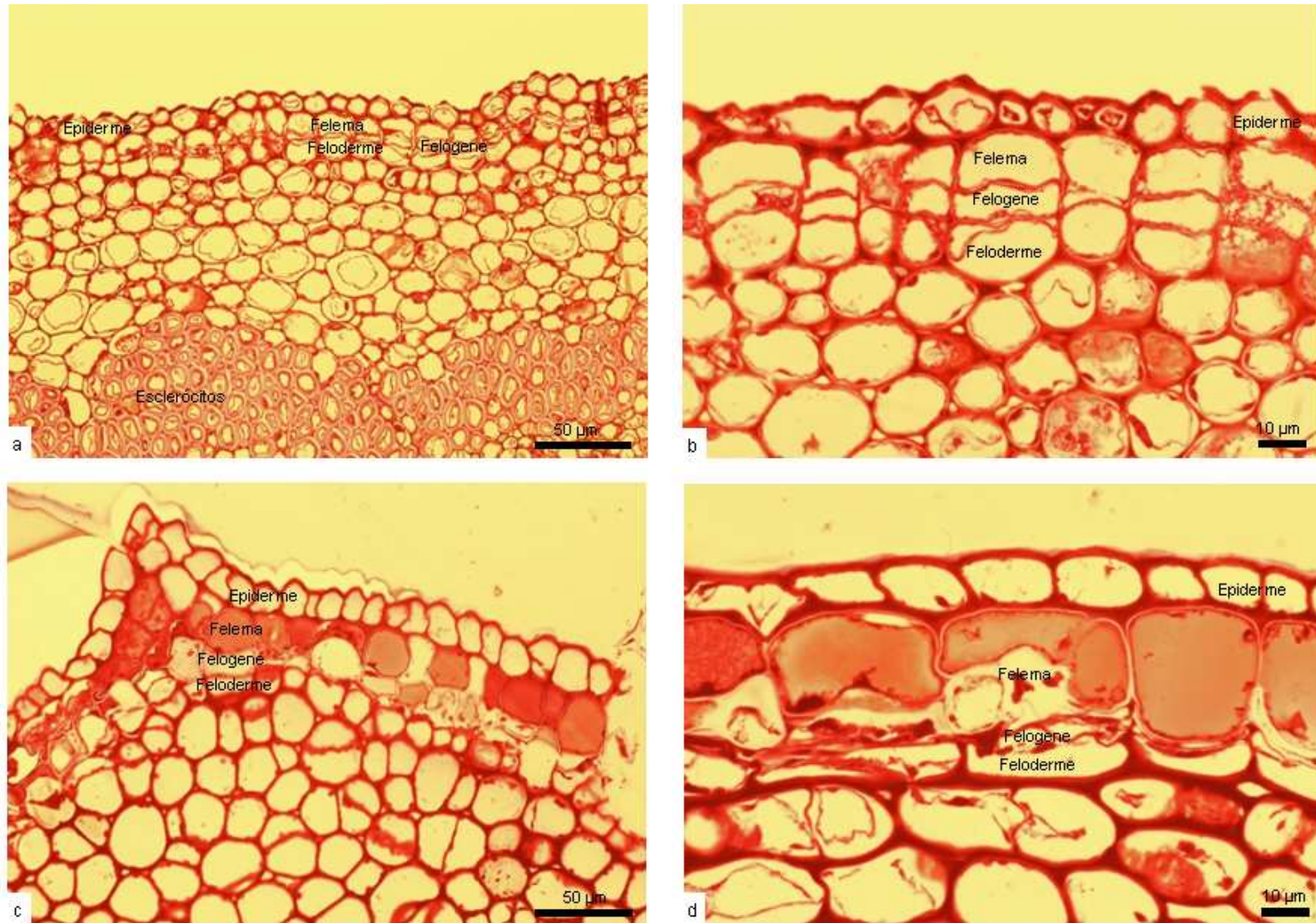
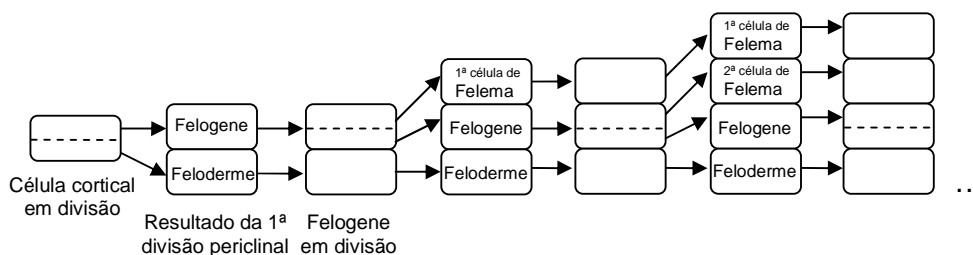


Figura 19 – Formação da periderme em caules jovens de sobreiro. Níveis de altura do caule intermédio (a e b) e inferior (c e d). (Luz transmitida com Pironina Y)

Por último, no nível de altura inferior, correspondente ao nível de altura com tecidos mais diferenciados do que os níveis superior e intermédio observa-se igualmente a presença de epiderme, felema, felogene, feloderme, córtex primário com esclerócitos, floema secundário e câmbio vascular (Figura 18 c). Neste nível os tecidos secundários, periderme e tecidos vasculares estão mais diferenciados do que os observados no nível intermédio.

### 3.2.2 A formação da primeira felogene em caules jovens de sobreiro



O facto da felogene se formar numa fase muito inicial do desenvolvimento dos caules de sobreiro, foi também observado por Graça e Pereira (1993, 2004), em plantas envasadas num estudo da epiderme e formação da primeira felogene em plantas de sobreiro semeados em estufa. Nos casos observados por estes autores, a formação da felogene aconteceu sempre depois da formação do câmbio vascular e do início da sua actividade, o que mais uma vez se verifica nos resultados obtidos no presente trabalho, no nível de altura superior (Figuras 18 a e, 19 a) em que já se observa a actividade ao nível do câmbio vascular, podendo comprovar-se com o brilho, identificativo da presença de estruturas organizadas,

em algumas paredes celulares de fibras xilémicas que, poderão estar em processo de diferenciação, não existindo ainda neste nível de altura a felogene.

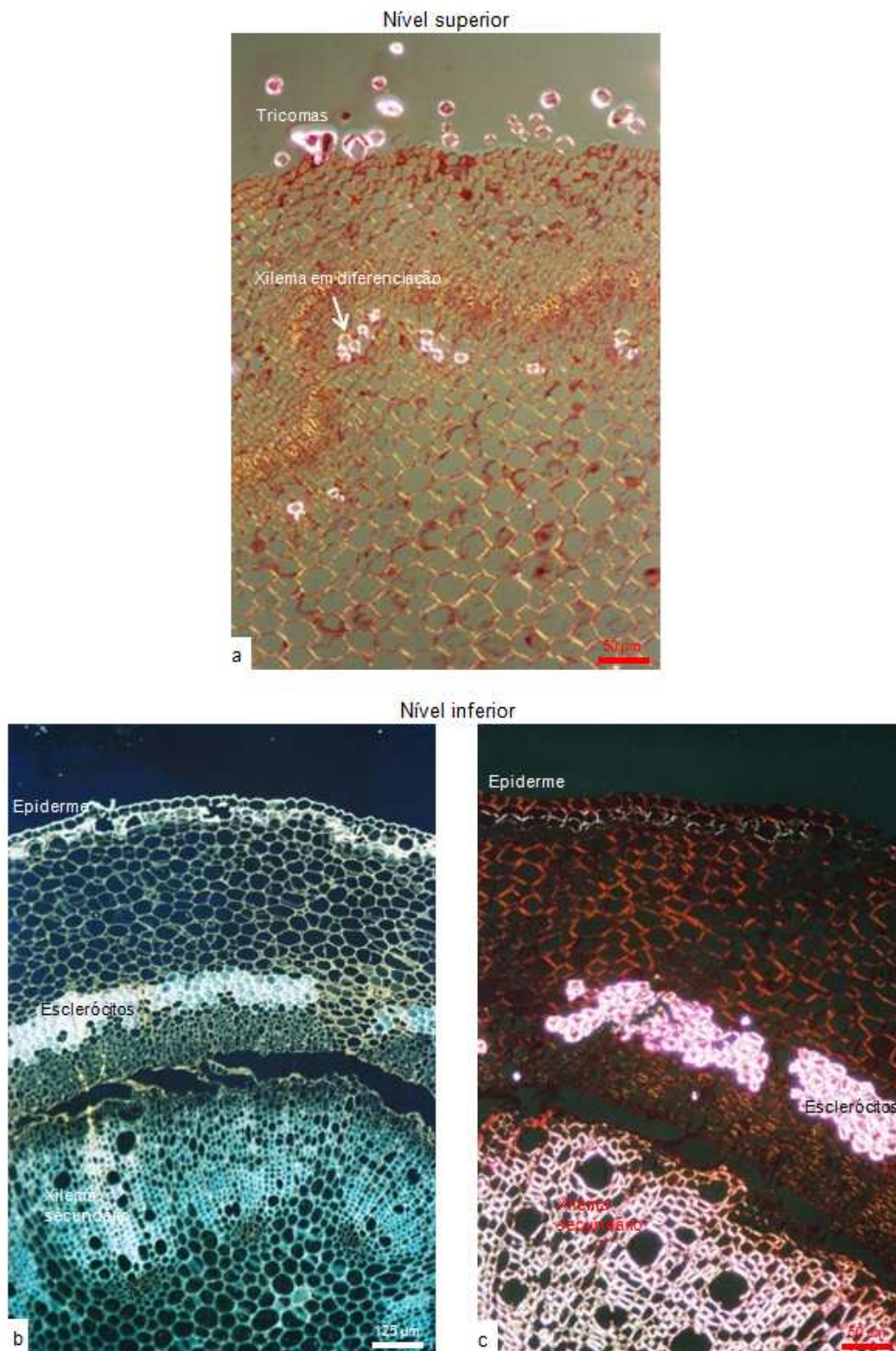
A formação da felogene, observada no nível de altura intermédio, acontece na camada de células imediatamente abaixo da epiderme (Figuras 19 a e, b) conforme verificado anteriormente por Graça e Pereira (1993, 2004), e ao contrário do descrito por Fahn (1985) que afirma que a primeira felogene em *Quercus suber* se inicia na própria epiderme. A célula subepidérmica começa por se dividir em duas células; a célula que fica situada mais interiormente constitui-se como feloderme; a célula situada mais exteriormente sofre uma segunda divisão; desta segunda divisão a célula de paredes finas situada mais interiormente constitui-se como a felogene e a situada mais exteriormente como primeira célula de felema; esta felogene começa imediatamente a dividir-se para o exterior, iniciando a produção das células felémicas (Figuras 19 b e 22 a).

No nível de altura inferior, correspondente aos tecidos mais diferenciados, evidenciam-se já alterações estruturais nas células do felema em formação, progredindo o processo de divisão ao nível da felogene (Figuras 19 c e, d). Já é possível observar que existe autofluorescência nas paredes celulares destas células, visível como brilho, indicativo da presença de organização estrutural dos seus componentes celulares (Figuras 21 b e, c). No nível inferior, mais antigo no tempo a periderme do sobreiro já está bem definida, sendo reconhecíveis o felema, a felogene e feloderme (Figuras 19 c e, d).

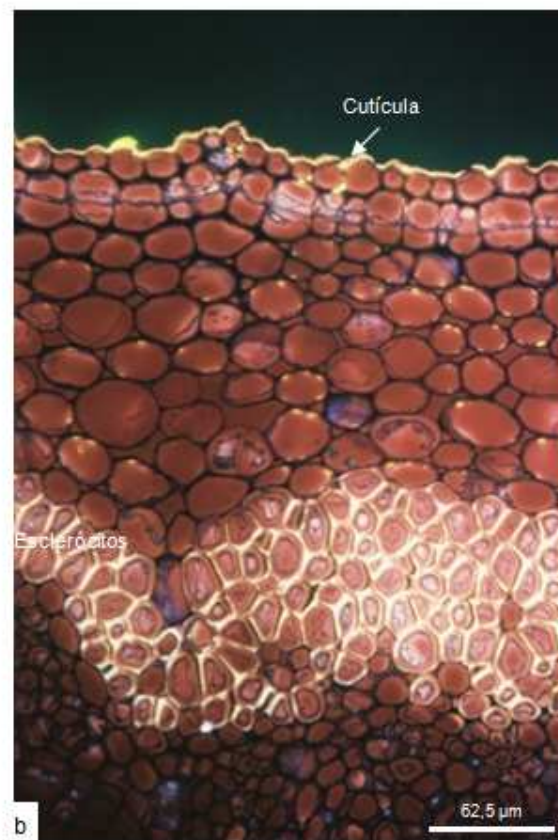
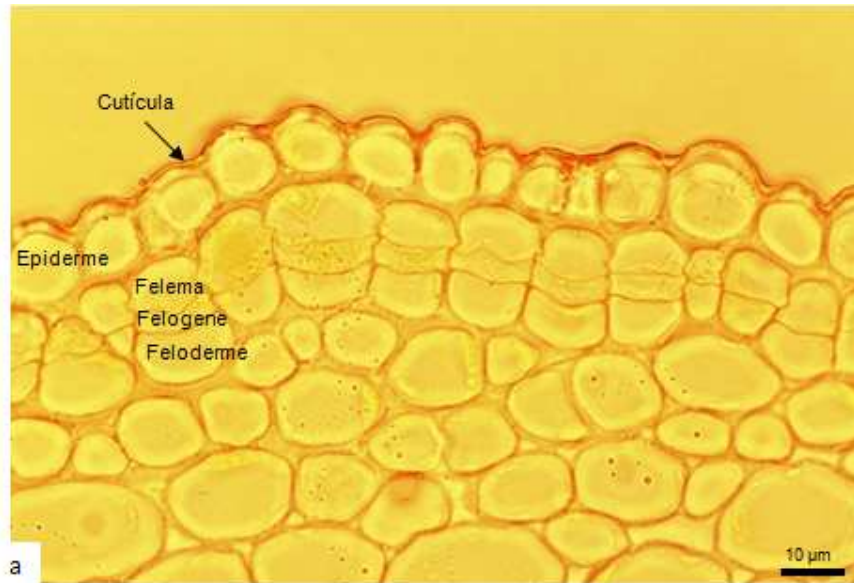
### **3.2.3 O processo de suberificação nas primeiras células de cortiça**

Apesar de no nível de altura intermédio já se observar a fiada das primeiras células de felema, o processo de suberificação, ou seja a formação da parede celular suberificada, ainda está numa fase muito incipiente (Figuras 22 a e, b), pela ausência das colorações típicas da suberina. Neste nível de altura observa-se o processo de lenhificação das paredes das células de parênquima cortical primário que se estão a diferenciar como esclerócitos (Figura 22 b). Este facto mostra que o processo de suberificação das paredes celulares do felema não se inicia logo após a primeira divisão celular da felogene. As primeiras células de cortiça em processo de suberificação das suas paredes celulares, já são contudo visíveis no nível de altura inferior do caule (Figuras 23 a, b e d). Neste mesmo nível de altura observa-se que existem duas fiadas de células de felema com formas bastante irregulares e com conteúdo citoplasmático, em fase de suberificação das suas paredes celulares (Figuras 23 a, b e d). Graça e Pereira (2004), afirmam que a divisão da felogene ocorre somente após a completa suberificação da parede celular da célula resultante da divisão anterior o que foi igualmente observado neste trabalho uma vez que a





**Figura 21 – Formação da primeira periderme em caules jovens de sobreiro. (Luz polarizada (a e c) com Pironina Y e, luz fluorescente sem corante (“autofluorescência”) (b))**



**Figura 22 – Nível de altura intermédio de caules jovens de sobreiro com formação da primeira periderme. (Luz transmitida com Sudão IV (a) e luz fluorescente com Berberina/Cristal violeta (b))**

presença de suberina só é identificada na célula resultante da primeira divisão e que está localizada mais exteriormente, permanecendo mais internamente três células que deverão corresponder uma a felema, outra à felogene e uma última e mais interna à feloderme (Figuras 23 b). Parece que a felogene só se divide após a completa diferenciação celular das células de felema resultantes da divisão anterior, uma situação eventualmente induzida pela necessidade de protecção conferida pela parede celular suberificada (Graça e Pereira, 2004). Enquanto o processo de suberificação ocorre, salienta-se o facto da deposição da lenhina na parede celular dos esclerócitos que lhes estão subjacentes já ser evidente (Figura 23 c).

### **3.3 A formação da cortiça amadia em árvores em exploração de cortiça**

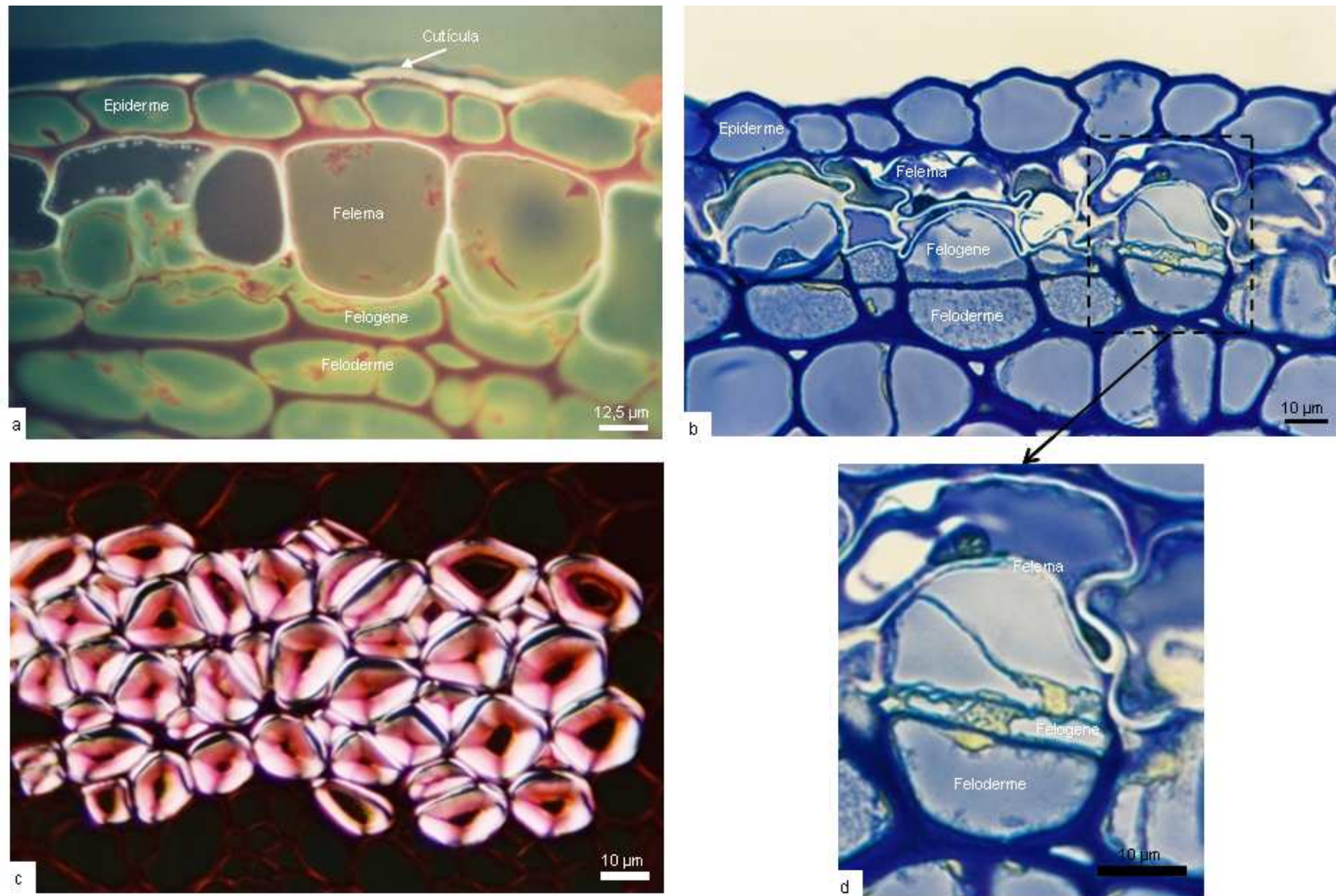
O estudo do processo de formação da cortiça em árvores em produção activa de cortiça amadia foi feito em amostras recolhidas e fixadas imediatamente após a extracção da cortiça. As árvores amostradas encontravam-se no seu ciclo de exploração comercial normal, e, no momento da separação da cortiça da árvore, por um tirador profissional, foram recolhidas amostras do lado da barriga que foram imediatamente colocadas no líquido fixador (FAA). Depois das amostras terem sido incluídas em Technovit® 7100 e de terem sido realizados cortes histológicos com espessuras de 2 µm, foram feitas observações microscópicas com luz polarizada, fluorescente e transmitida, tendo sido também alguns destes cortes devidamente corados com diversos corantes para luz visível e para luz fluorescente (Pironina Y, Berberina/Cristal violeta, Sudão IV, Calcofluor, Acridina laranja e Azul de toluidina O).

Outras amostras de cortiça, após fixação em FAA foram desidratadas em etanol e secas em vácuo e revestidas a ouro para observações por microscopia electrónica de varrimento (FEG-SEM).

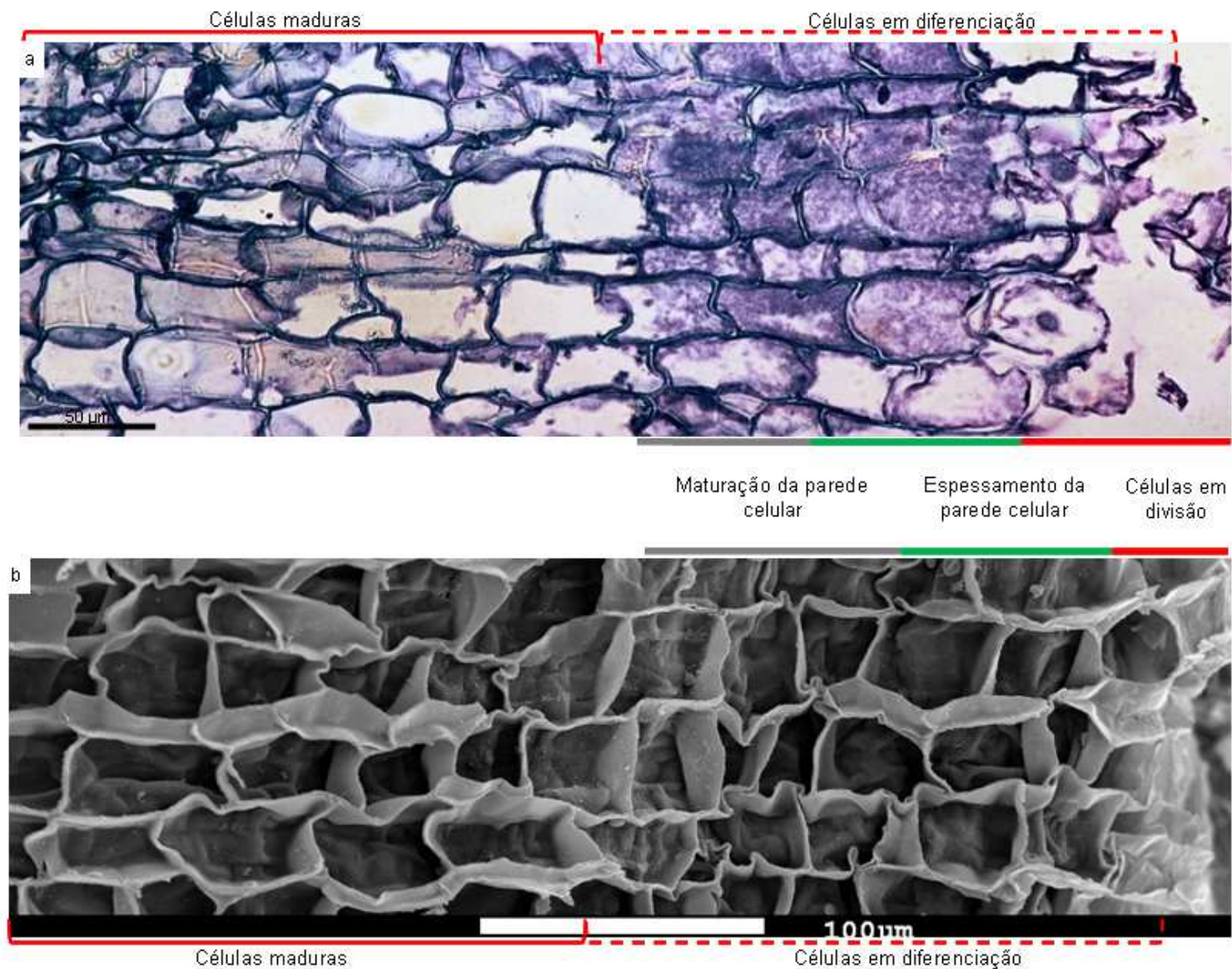
#### **3.3.1 A localização do rasgamento de cortiça no momento da extracção**

O rasgamento da cortiça no acto do descortiçamento dá-se nas células da própria felogene e naquelas imediatamente resultantes da divisão da felogene, uma vez que as células nesta zona de rasgamento (que é a zona das células em divisão) ainda possuem núcleos bem evidentes e conteúdo citoplasmático (Figura 24 a) indicativos de células vivas e eventualmente ainda em processo de divisão. Esta “camada” de células na superfície da barriga ainda em divisão ou numa fase muito inicial do processo de diferenciação, anexa ao local onde se dá o rasgamento, inclui não mais que uma ou duas fiadas de células.





**Figura 23 – Pormenores das primeiras divisões da felogene e dos esclerócitos no nível de altura inferior de caules jovens de sobreiro. (Luz fluorescente e polarizada com Pironina Y (a e c) e, luz transmitida com Berberina/Cristal violeta (b e d))**



**Figura 24 – Formação da cortiça amadia em árvores em exploração de cortiça: Células da cortiça em processo de diferenciação e células maduras. (Luz transmitida com Azul de toluidina O (a) e Microscopia electrónica de varrimento (b))**

### **3.3.2 Processo geral de diferenciação das células de tecido suberoso**

Tratando-se a cortiça madura de um tecido citoplasmaticamente morto, originado pela felogene, tecido meristemático que, após a sua divisão celular, origina células que irão sofrer diferenciação celular e suberificação das suas paredes celulares, na Figura 24 é possível observarem-se essencialmente duas grandes zonas que designamos por zona com células em diferenciação e zona com células maduras.

Na zona das células em diferenciação podem ainda distinguir-se três subzonas, conforme apresentado na Figura 24:

- Zona de células em divisão – com cerca de uma a duas células, correspondentes às últimas formadas pela felogene com núcleos e citoplasma evidentes; é nestas células que ocorre o rasgamento e separação da cortiça conforma acima descrito;
- Zona de espessamento da parede – cujas células possuem paredes celulares que se encontram em fase de espessamento e,
- Zona de maturação da parede celular – com células com paredes celulares já mais espessas, mas ainda com conteúdo celular, podendo indicar que, embora o(s) processo(s) de diferenciação e/ou suberificação já possa(m) estar concluído(s) ou em conclusão, ainda podem estar a ocorrer transformações ao nível celular até que se dê a morte das células.

Na zona de células maduras, as células já não apresentam conteúdo celular e as suas paredes celulares estão completamente formadas (Figura 27).

### **3.3.3 Formação da parede celular durante o processo de suberificação**

Na zona designada anteriormente de zona de células em divisão, as paredes celulares das células apresentam-se finas e constituídas essencialmente por celulose (Figuras 25 e, 27 a), evidenciando-se a presença de núcleos e conteúdo celular (Figura 26 b). Na zona de espessamento da parede, conforme a própria designação indica, ocorre o processo de suberificação com a deposição da parede secundária nas paredes celulares (Figuras 25 e, 26) observando-se a deposição de substâncias ao nível da parede celular através do conteúdo citoplasmático (Figura 26 b).

Ainda na zona em diferenciação e nas 3<sup>a</sup>-4<sup>a</sup> células é evidente que a deposição da parede secundária está completa na maior parte da sua espessura embora ainda se observem conteúdos celulares (Figura 25). Nesta camada é visível também a deposição da parede terciária (Figura 26 b), podendo afirmar-se que nesta zona em diferenciação o processo de suberificação das paredes celulares está completo, o que demonstra que se trata de um processo rápido. Nas células onde ocorre a maturação da parede celular (Figuras 28 a e,



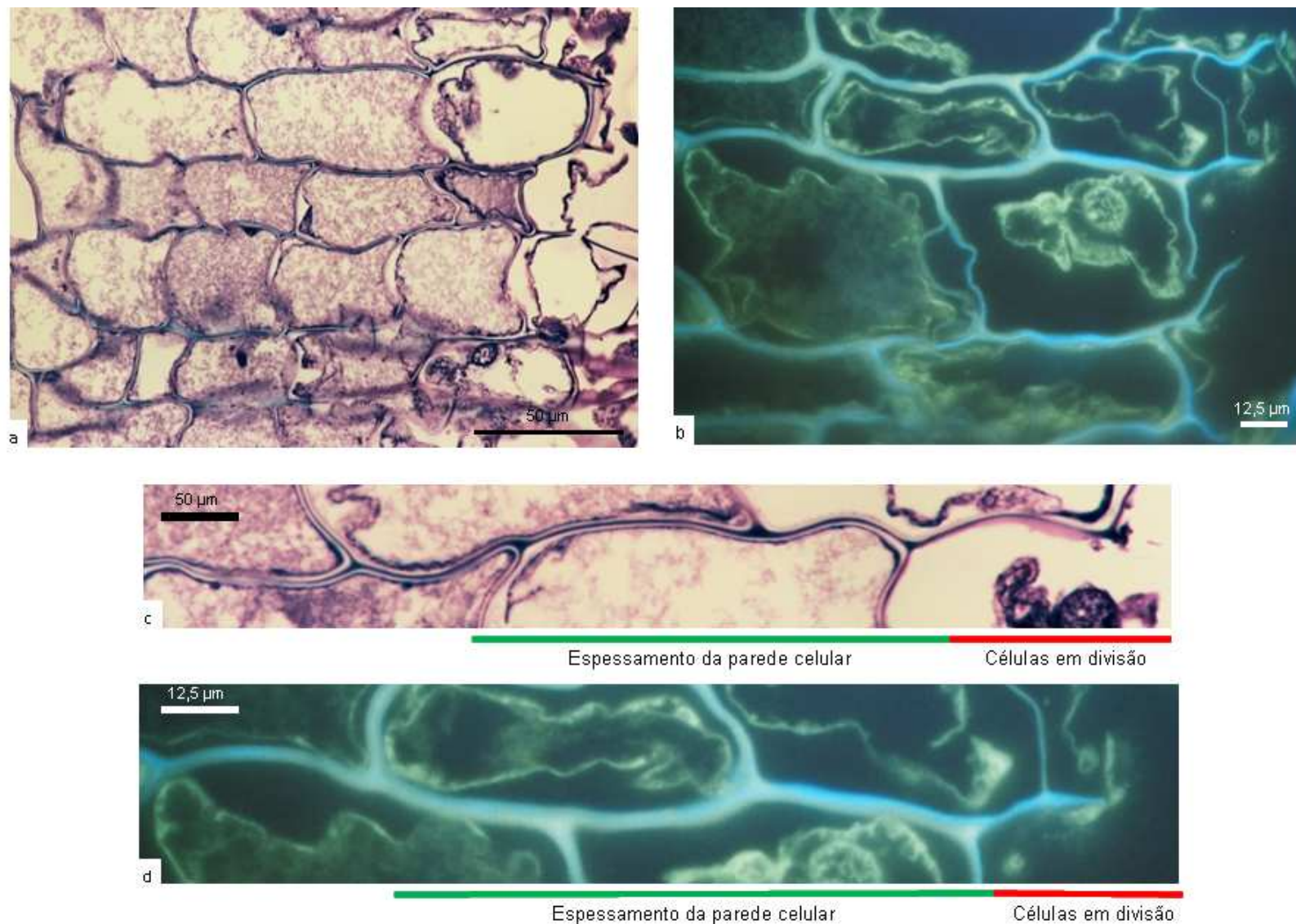
b) observa-se que as paredes celulares estão completamente formadas, pelo menos na sua forma e espessura. Na zona das células maduras, já sem conteúdo celular, com as paredes celulares completamente formadas, pode observar-se a lamela média, a parede primária, parede secundária mais espessa, onde se localiza a suberina e, a parede terciária, situada interiormente e em contacto com o lúmen da célula (Figuras 28 c e, d). Observou-se que é no tecido maduro da cortiça que as células ficaram em piores condições quando incluídas em Technovit® 7100, resultando este facto da maior dificuldade de impregnação da resina nos tecidos; isto pode ser explicado pela impermeabilização das paredes celulares resultante da deposição de suberina (Figura 24 a). Por outro lado, também é possível verificar que as paredes celulares das células de tecido suberoso maduro se apresentam menos enrugadas e mais espessas, com aproximadamente 0,824 µm, quando comparadas com as da zona de células em divisão e nas primeiras células em espessamento da parede, onde medem aproximadamente 0,435 µm, considerando sempre a parede dupla de duas células contíguas (Figuras 24 b e, 27).

### **3.4 As paredes celulares suberificadas na periderme da batata com os genes de suberina modificados**

O estudo da estrutura da periderme da batata, foi realizado em quatro amostras de batata, tendo sido "silenciados" em três delas, três genes diferentes, presumivelmente envolvidos na síntese da suberina, *STKCS6#34*, *CYP86A33#3* e *FHT#37*. Destas amostras previamente fixadas em FAA, e incluídas em Technovit® 7100 foram obtidos cortes histológicos semi-finos (2 µm de espessura), sobre as quais foram realizadas observações microscópicas com luz fluorescente, polarizada e transmitida, tendo sido também aplicadas diversas colorações com corantes gerais como: Pironina Y, Acridina laranja e Azul de toluidina O e, corantes específicos como: Berberina/Cristal violeta, Sudão IV e, Calcofluor. Amostras das peridermes destas batatas também foram observadas num microscópio electrónico de varrimento FEG-SEM.

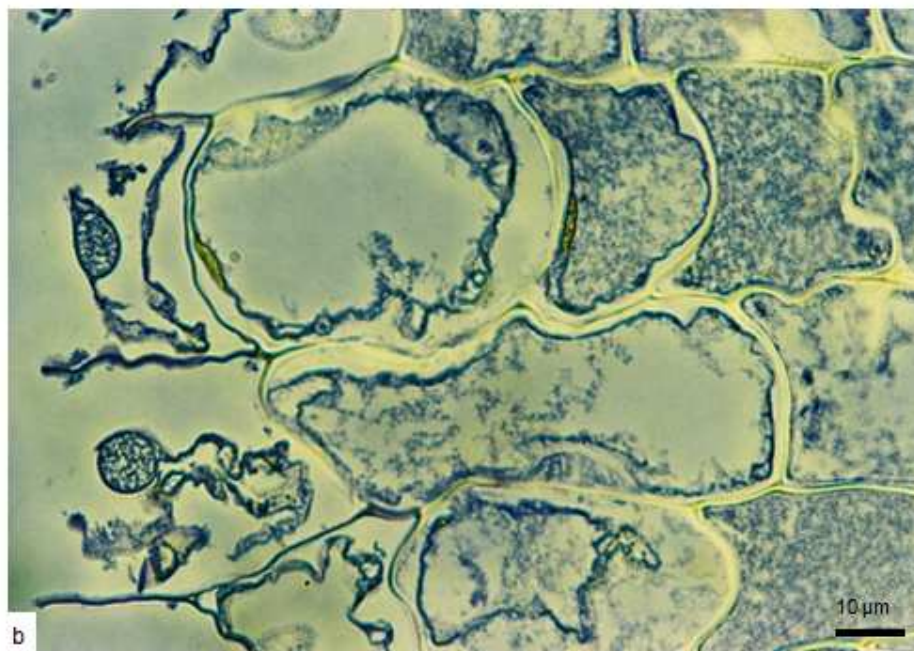
#### **3.4.1 Estrutura da periderme da batata**

A estrutura da periderme da batata apresentada, corresponde à da batata mutante *STKCS6#34*, já que os cortes histológicos das amostras de batata da variedade Desirée foram os menos bem conseguidos como resultado da provável impermeabilização das suas paredes celulares resultantes da presença de suberina sem qualquer alteração genética, conforme se pode verificar pela Figura 30 a. Assim, a periderme da batata é formada, tal

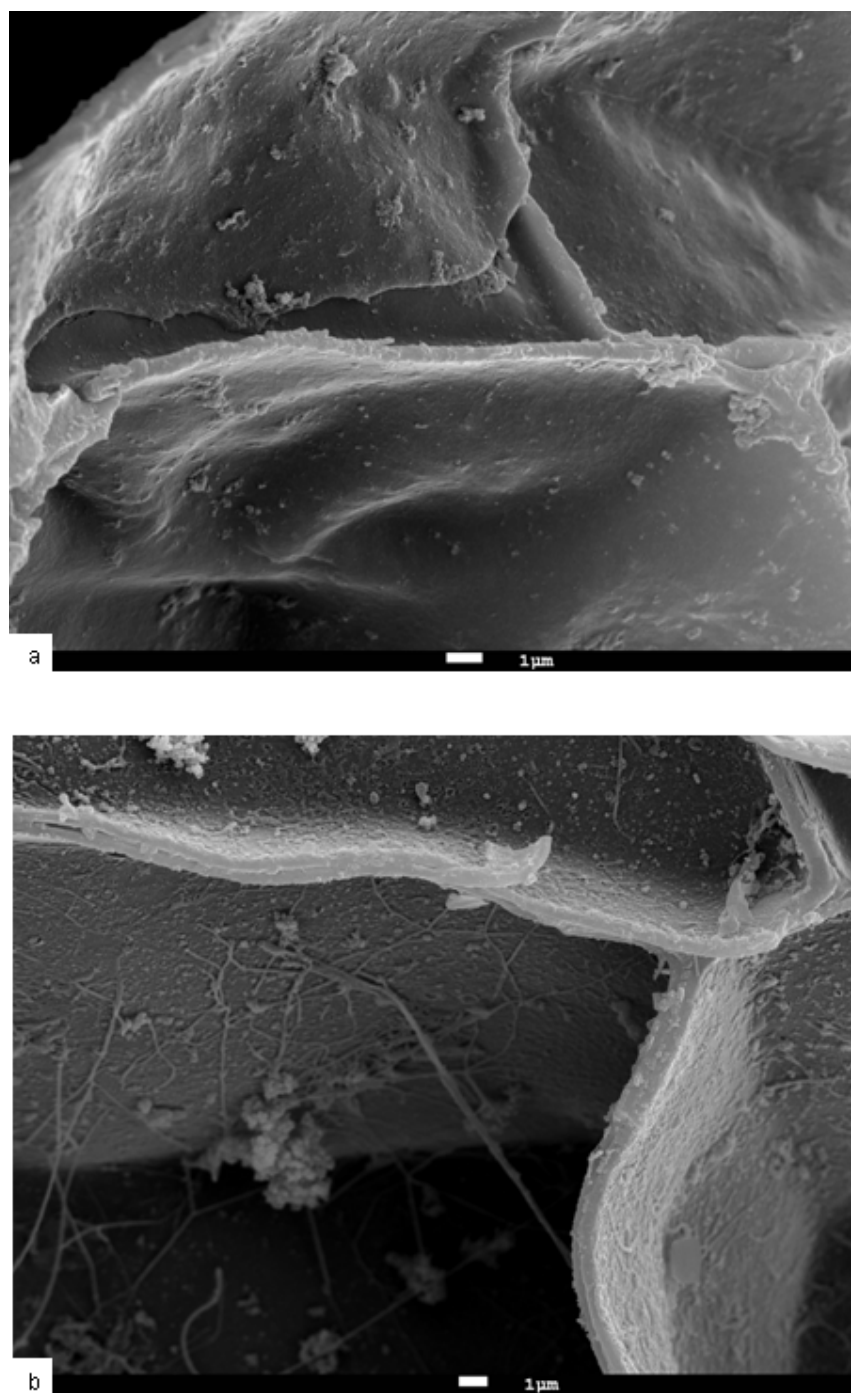


**Figura 25 – Formação da parede celular das células do tecido suberoso. (Luz transmitida com Azul de toluidina O (a e c) e, luz fluorescente com Calcofluor (b e d))**

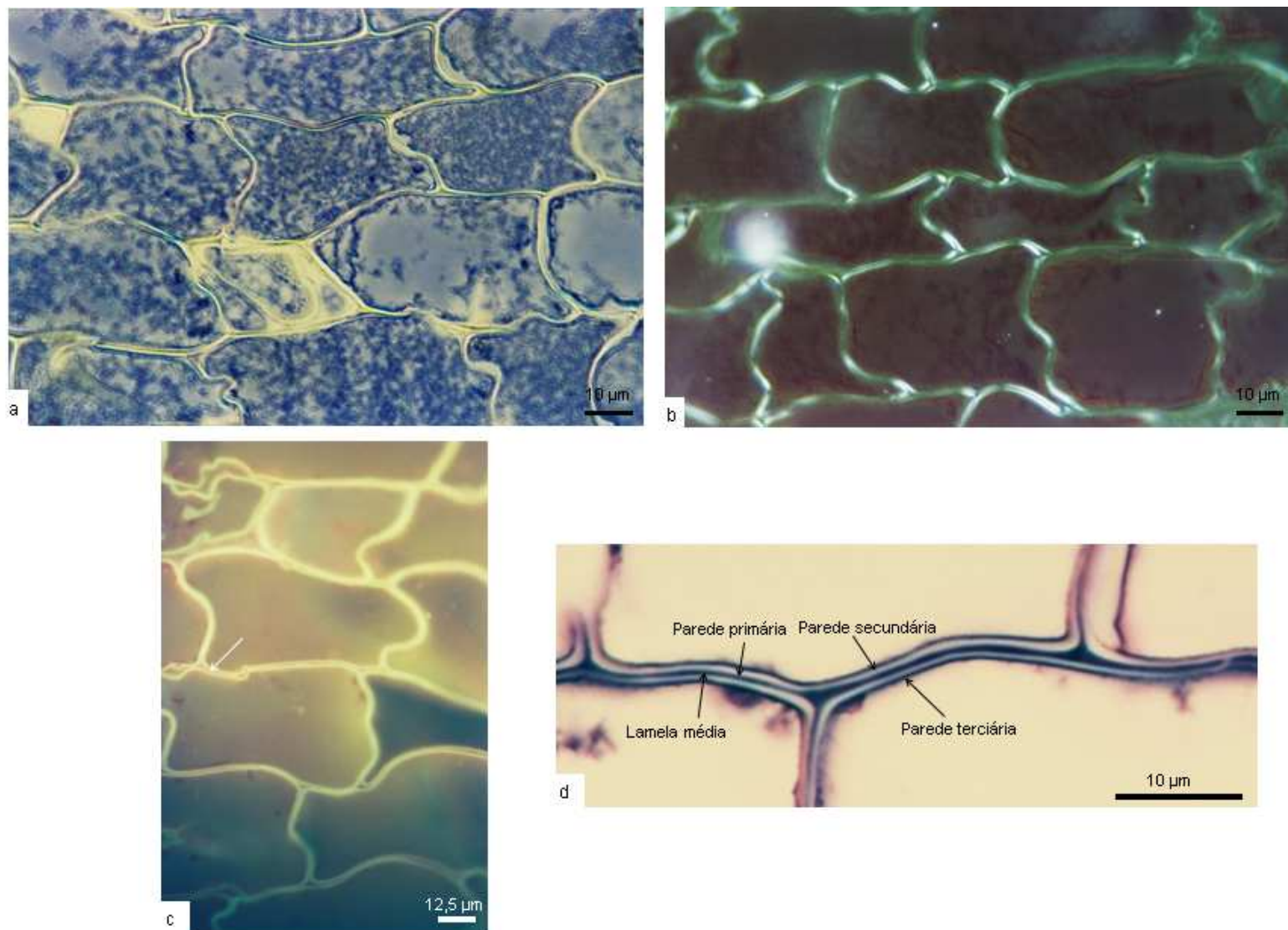




**Figura 26 – Células suberificadas em diferenciação e formação da parede celular. (Luz transmitida com Sudão IV (a) e, luz polarizada com Berberina/Cristal violeta (b))**



**Figura 27 – Parede celular das células da zona de células em divisão (a) e de células maduras (b). (Microscopia electrónica de varrimento)**



**Figura 28 – Células de cortiça em maturação das paredes celulares e células maduras. (Luz polarizada com Berberina/Cristal violeta (a) e sem corante (b), luz fluorescente com Pironina Y (c) seta – lamela média não corada e, luz transmitida com Azul de toluidina O (d))**

como a do sobreiro, por felogene, felema e feloderme (Figura 29), o que está conforme com o descrito na bibliografia (Reeve et al., 1969) embora Lulai e Freeman (2001) afirmem que permanecem algumas dúvidas quanto à fisiologia da periderme da batata.

Após a formação da felogene, com actividade meristemática, esta vai dividir-se periclinalmente e formar para o exterior felema e para o interior feloderme. A feloderme na periderme da batata é formada apenas por uma fiada de células (Figura 29). Nas amostras de batata utilizadas para este trabalho o processo de suberificação já estava terminado (condição conhecida em termos de número de dias de maturação do tubérculo) e partindo do princípio que, no processo de divisão da felogene esta origina duas células filhas, uma para dentro (feloderme) e uma outra para fora (felema) e, sabendo-se que apenas a felogene mantém a capacidade de produzir novas células pode afirmar-se que, a própria felogene se divide também anticlinalmente devido ao crescimento em diâmetro da batata, verificando-se que o número de células de felogene, felema e feloderme não corresponde verticalmente (Figura 29).

Lulai e Freeman (2001) consideram que as paredes celulares da felogene, com a maturação da periderme, sofrem alterações morfológicas, tornando-se a felogene inactiva o que confirma a nossa hipótese de que, no final do processo de suberificação do felema as paredes celulares das células de felogene também se suberificam.

#### **3.4.2 As células suberificadas na periderme da batata de variedade Desirée**

Na periderme da batata da variedade Desirée, semelhante estruturalmente à descrita anteriormente em 3.4.1 e, também às peridermes das variedades de batatas 'Russet Burbank' e 'Kennebec' descritas, respectivamente, por Sabba e Lulai (2002) e, Lulai e Freeman (2001), o felema é o tecido com maior número de células com paredes celulares suberificadas (Figuras 30 e, 31) e é identificado pela forte autofluorescência das suas paredes celulares (Figura 31 c), com aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  de espessura e cerca de 10-14 células de espessura radial (Figuras 30, 31 e, 34 a). Estas observações são próximas do referido por Peterson et al. (1985) in Steven e Lulai (1991) que observou que a periderme de batatas 'maduras' é composta por 6-10 fiadas de células com paredes suberificadas.

Comparativamente com a espessura das paredes celulares maduras da cortiça observa-se que as da batata Desirée são mais finas com, 0,824  $\mu\text{m}$  e 0,577  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Figuras 36 a e, b). Em trabalhos realizados por microscopia electrónica de transmissão (TEM) com ampliações elevadas, comparando a estrutura lamelar da parede secundária das células de batata com a da cortiça (Figuras 13 b e 14), é evidente que a espessura desta camada e o número de lamelas na batata é inferior, o que poderá explicar o facto de, com o



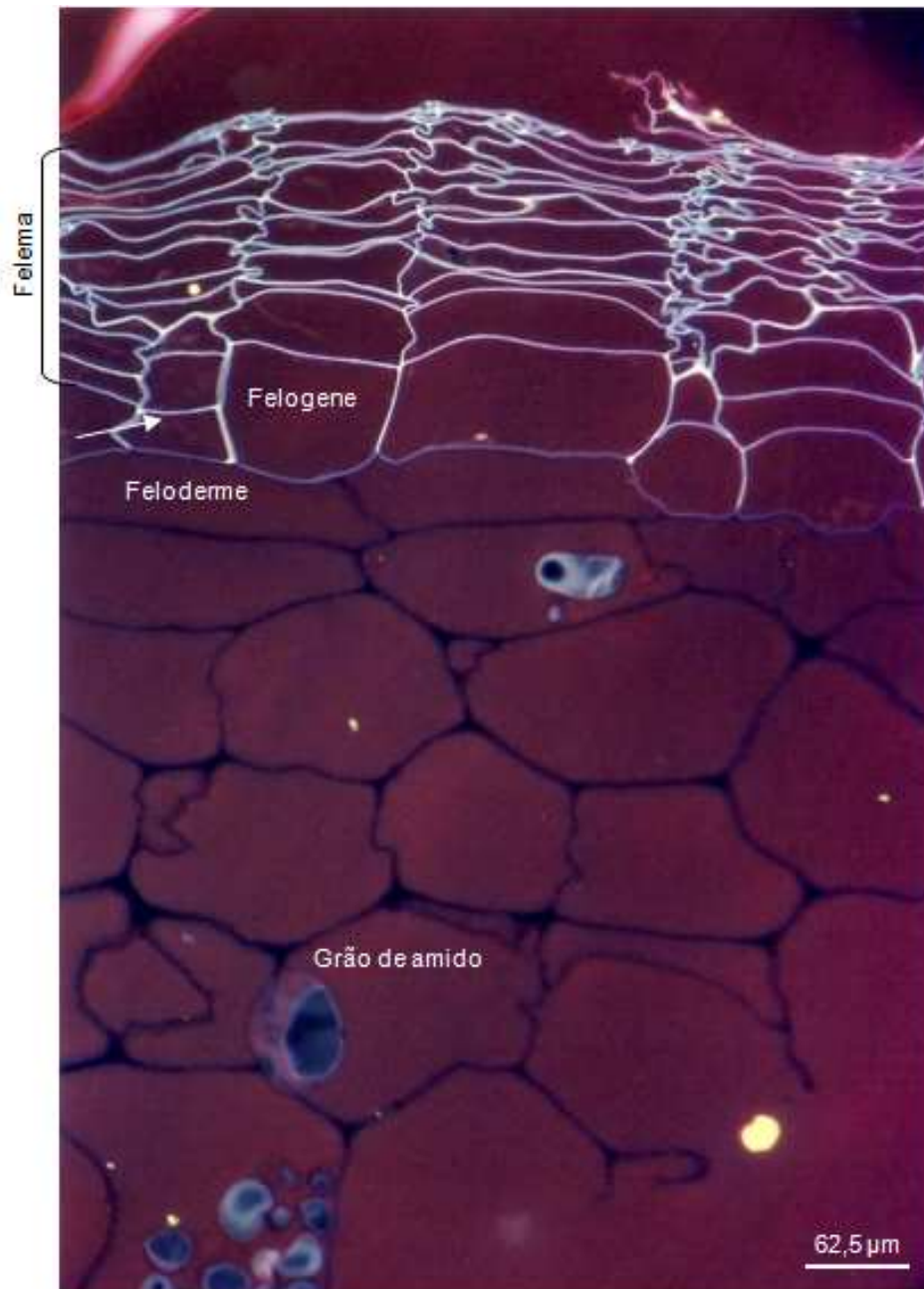


Figura 29 – Estrutura geral da periderme da batata *STKCS6#34*. (Luz fluorescente com Berberina/Cristal violeta, seta – células resultantes da divisão anticlinal da felogene)

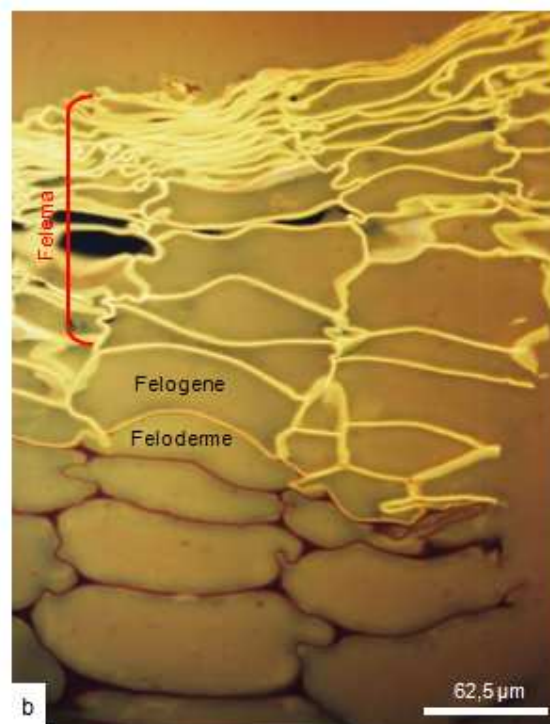
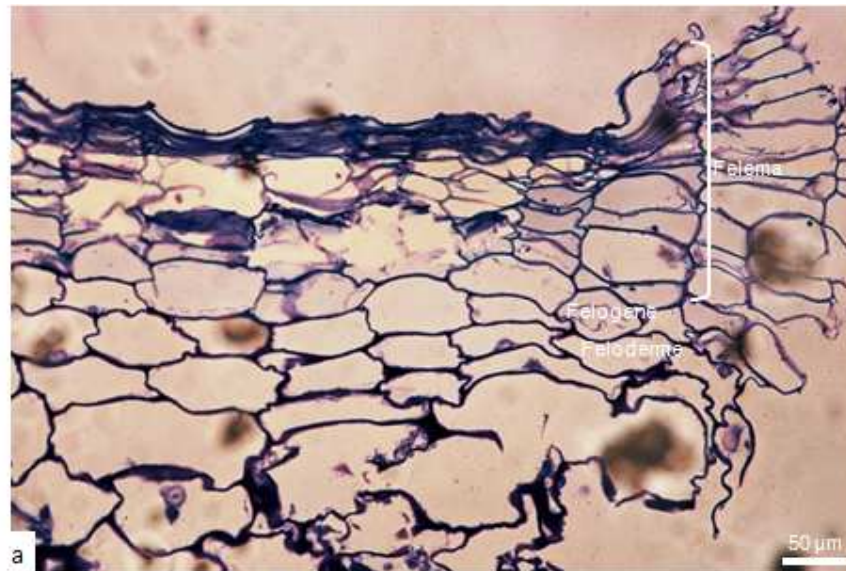


Figura 30 – Periderme da batata Desirée. (Luz transmitida com Azul de toluidina O (a) e, luz fluorescente com Pironina Y (b))

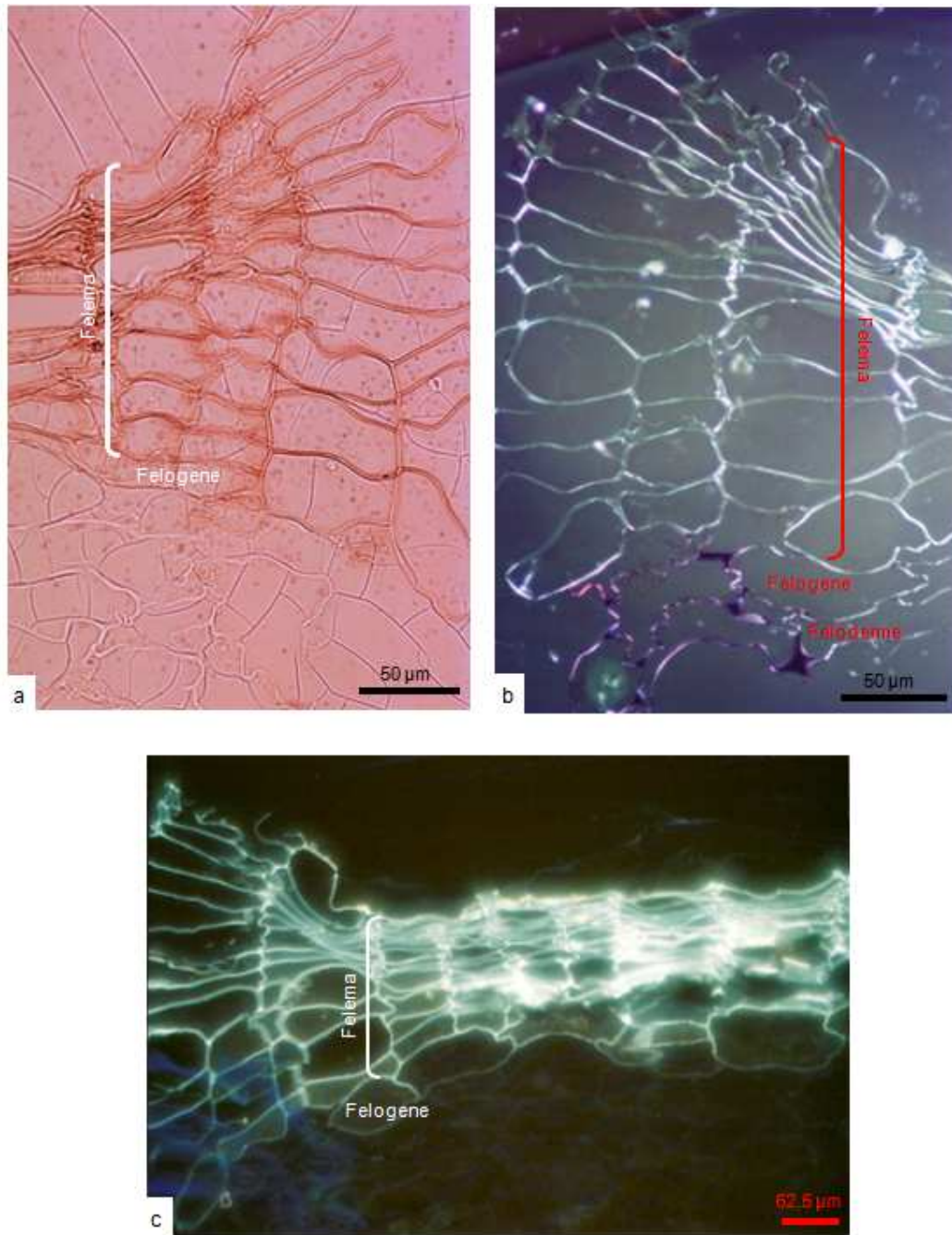
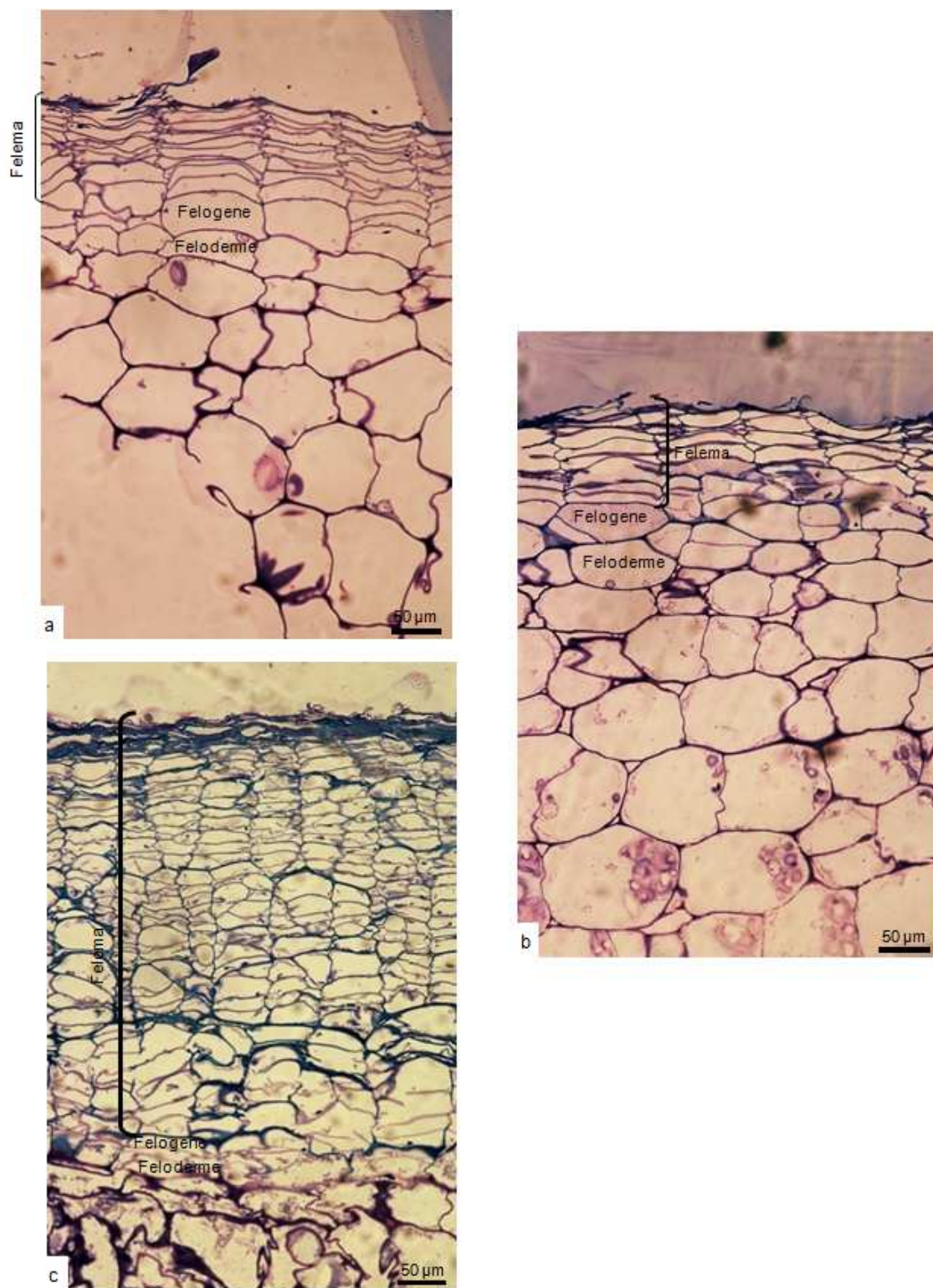


Figura 31 – Periderme da batata Desirée. (Luz transmitida com Sudão IV (a), Luz polarizada com Berberina/Cristal violeta (b) e, luz fluorescente sem corante (“autofluorescência”) (c))





**Figura 32 – Peridermes das batatas mutantes *STKCS6#34* (a), *CYP86A33#3* (b) e, *FHT#37* (c).  
(Luz transmitida com Azul de toluidina O)**



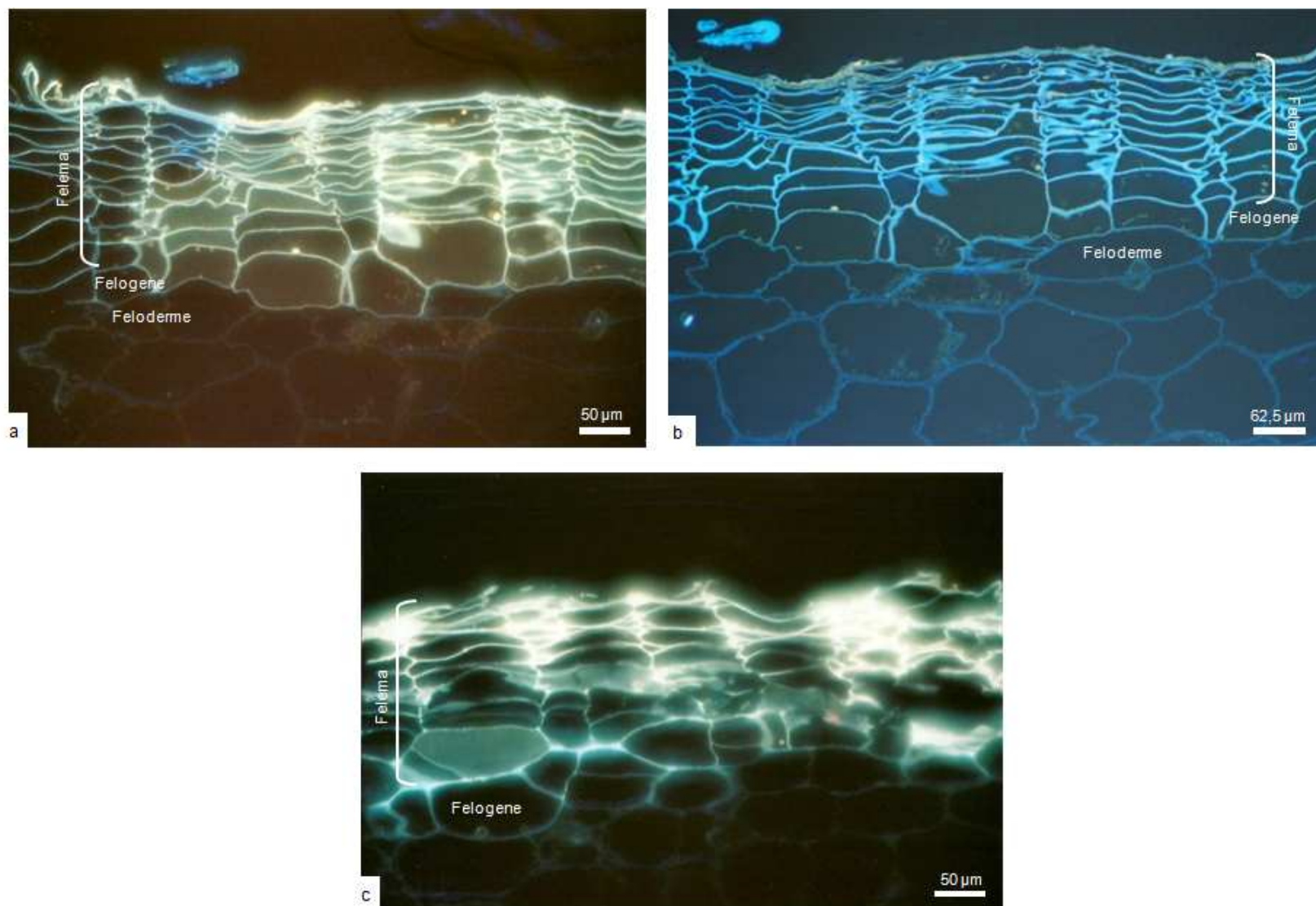


Figura 33 – Periderme das batatas mutantes *STKCS6#34* (a, b) e *CYP86A33#3* (c). (Luz fluorescente sem corante (“autofluorescência”) (a e c) e, com Calcofluor (b))

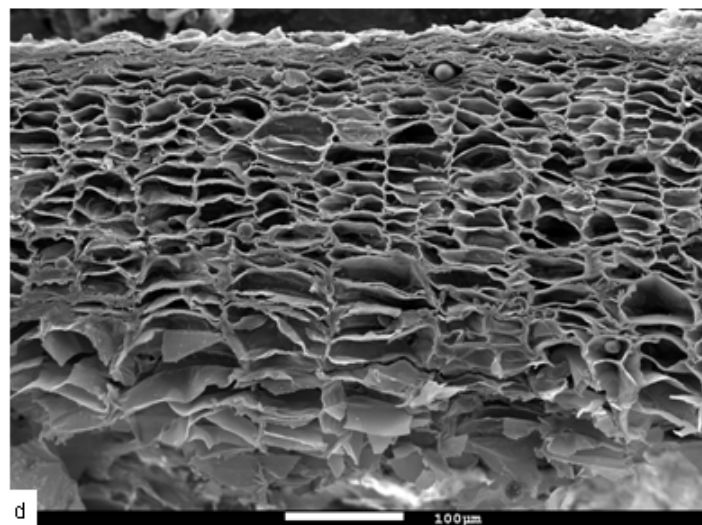
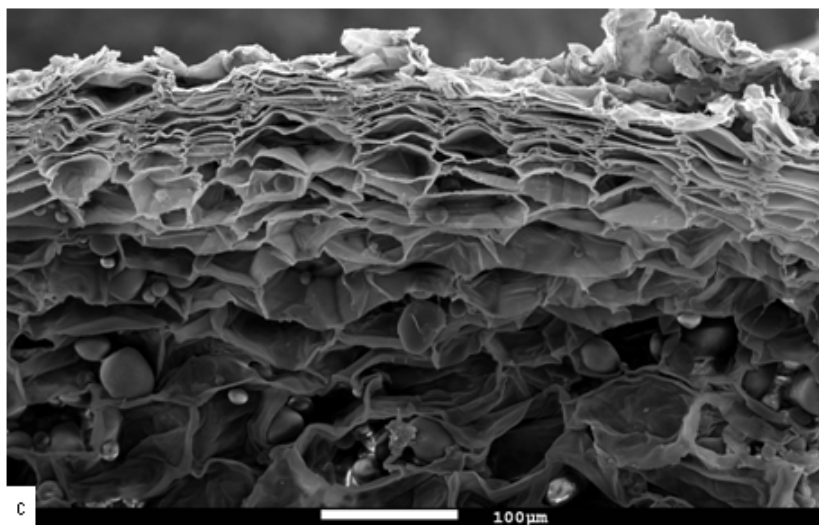
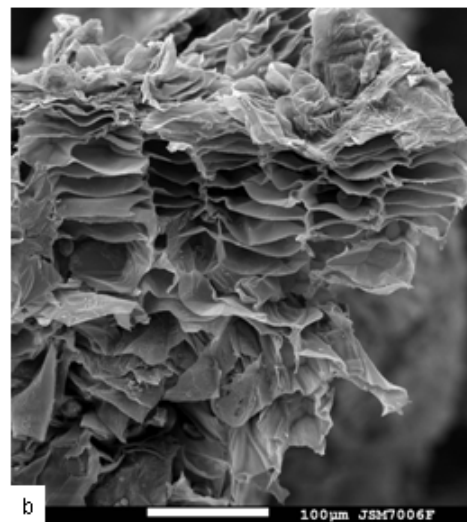
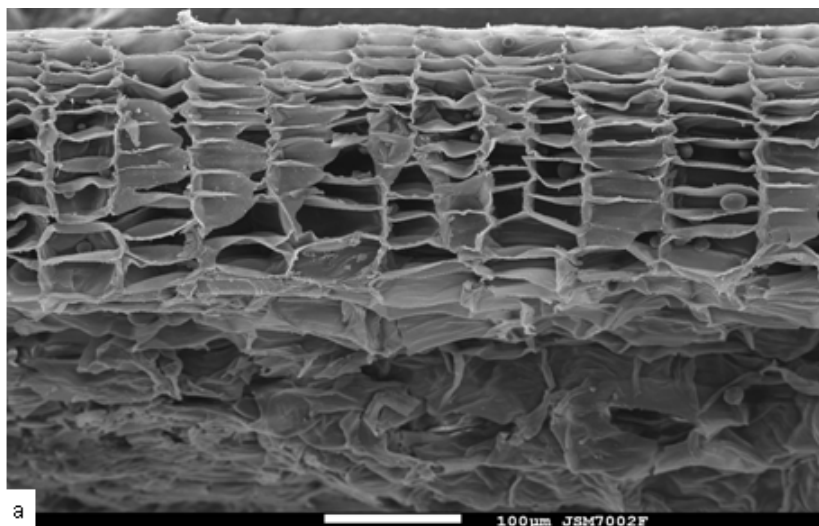


Figura 34 – Periderme das batatas. (Microscopia electrónica de varrimento - Desirée (a), STKCS6#34 (b), CYP86A33#3 (c) e, FHT#37 (d))

mesmo corante se obterem resultados de coloração diferentes conforme se pode verificar nas Figuras 36 a e, b. Outras observações feitas por TEM em amostras de cortiça de caules jovens de sobreiro (Teixeira e Pereira, 2010) não mostraram contudo a presença de lamelas. A forma como a suberina da batata (de constituição química algo diferente e mais simples que a da cortiça) se deposita e organiza na parede secundária poderá também ser um factor a ter em conta nos resultados obtidos o que só poderá ser estudado com o recurso a outras técnicas de microscopia como é o caso da microscopia electrónica de transmissão.

#### **3.4.3 As células suberificadas na periderme das batatas com os genes da suberina modificados: *STKCS6#34*, *CYP86A33#3* e *FHT#37***

As amostras de batatas *STKCS6#34*, *CYP86A33#3* e, *FHT#37*, cujos genes, presumivelmente responsáveis pela formação da suberina foram alterados, apresentam em termos anatómicos peridermes com diferenças significativas comparando com a periderme da variedade Desirée (Figuras 30, 32 e, 34). Essas diferenças em termos biométricos dizem respeito à espessura e correspondente número de células de felema, observando-se que a batata *FHT#37* é a que possui felema mais espesso, com aproximadamente 300 µm de espessura e o triplo do número de células de felema quando comparado com o felema das outras três amostras com cerca de 10 células (Figuras 30, 32, 34 b, c e, d), facto este igualmente verificado por Serra et al. (2010) em batatas com 21 dias de maturação. Talvez nesta batata as paredes celulares não 'consigam' suberificar ou terminar o processo de suberificação e em resposta a felogene produz células em maior quantidade.

Observações microscópicas (luz transmitida e fluorescente e microscopia electrónica - SEM e TEM) realizadas por Serra et al. (2009) mostraram que em termos comparativos ao nível da estrutura e ultra-estrutura da parede celular das células felémicas da periderme da batata Desirée, não existem diferenças entre estas e as da periderme das batatas com o gene *STKCS6#34* silenciado inclusivamente ao nível da estrutura ou ultra-estrutura da camada lamelar típica da suberina. No entanto os mesmos autores, em 2009a, verificaram com TEM que a periderme de batatas com o gene *CYP86A33#3* silenciado, apresenta uma redução ao nível da espessura da parede secundária e alterações ultra-estruturais da suberina comparando com as paredes celulares felémicas da periderme da batata Desirée.

Observa-se também que poderá haver diferenças em termos de constituição química das paredes celulares das células de felema das batatas em questão uma vez que as diferentes tonalidades adquiridas com os corantes assim o indicam (Figuras 32, 33 e, 35) embora a suberina esteja presente em todas elas (Figuras 33 a e, c e, 35 a).

Também ao nível da 'organização' das células de felema a batata *STKCS6#34* é a que mais se aproxima da variedade Desirée uma vez que as outras mutantes apresentam peridermes com células mais 'desorganizadas' principalmente na zona da felogene (Figuras 30 a, 31 c, 32, 33 a, c e, 35 a). O gene suprimido nesta batata é um dos que catalisa o alongamento das cadeias hidrocarbonadas, mas neste caso não parece ter resultados marcados no processo de suberificação e na estrutura geral das células da periderme, conforme o verificado por Serra et al. (2009).

Em termos de espessura e estrutura das paredes celulares das células da periderme das batatas mutantes verifica-se que, embora a mutante *CYP86A33#3* aparente paredes celulares mais finas quando comparado com as outras 2 mutantes e até mesmo com a Desirée (Figura 36), é a mutante *FHT#37* aquela em que as paredes celulares duplas, ou seja, de duas células contíguas, medem cerca de 0,304 µm de espessura, sendo as mais finas quando comparada com as outras amostras (0,577 µm Desirée, 0,437 µm *CYP86A33#3* e 0,420 µm *STKCS6#34*) (Figura 37). A mutante *FHT#37* é também aquela em que se observa uma maior variedade em termos de espessura da parede celular aparecendo algumas extremamente espessas cuja composição e estrutura são desconhecidas (Figuras 35 c e, 36 e e, f). Serra et al. (2010) sugerem através de observações por TEM que não existe diferença ao nível da estrutura ou ultra-estrutura lamelar da parede secundária das células felémicas da batata com *FHT#37* silenciado, quando comparada com a da variedade Desirée. Contudo, neste trabalho observámos que algumas células felémicas desta batata *FHT#37* apresentam paredes celulares muito espessas (Figura 36 f), com a zona da parede primária muito alargada, e com a estrutura ou ultra-estrutura da parede secundária lamelar alterada.

Neste caso do mutante *FHT#37*, foi silenciado o gene que promove a ligação entre os hidroxiácidos e o ácido ferúlico, provavelmente afectando de forma dramática a ligação entre a parte alifática da suberina e os polifenóis que lhe estão associados, alterando significativamente a estrutura das paredes celulares suberificadas.



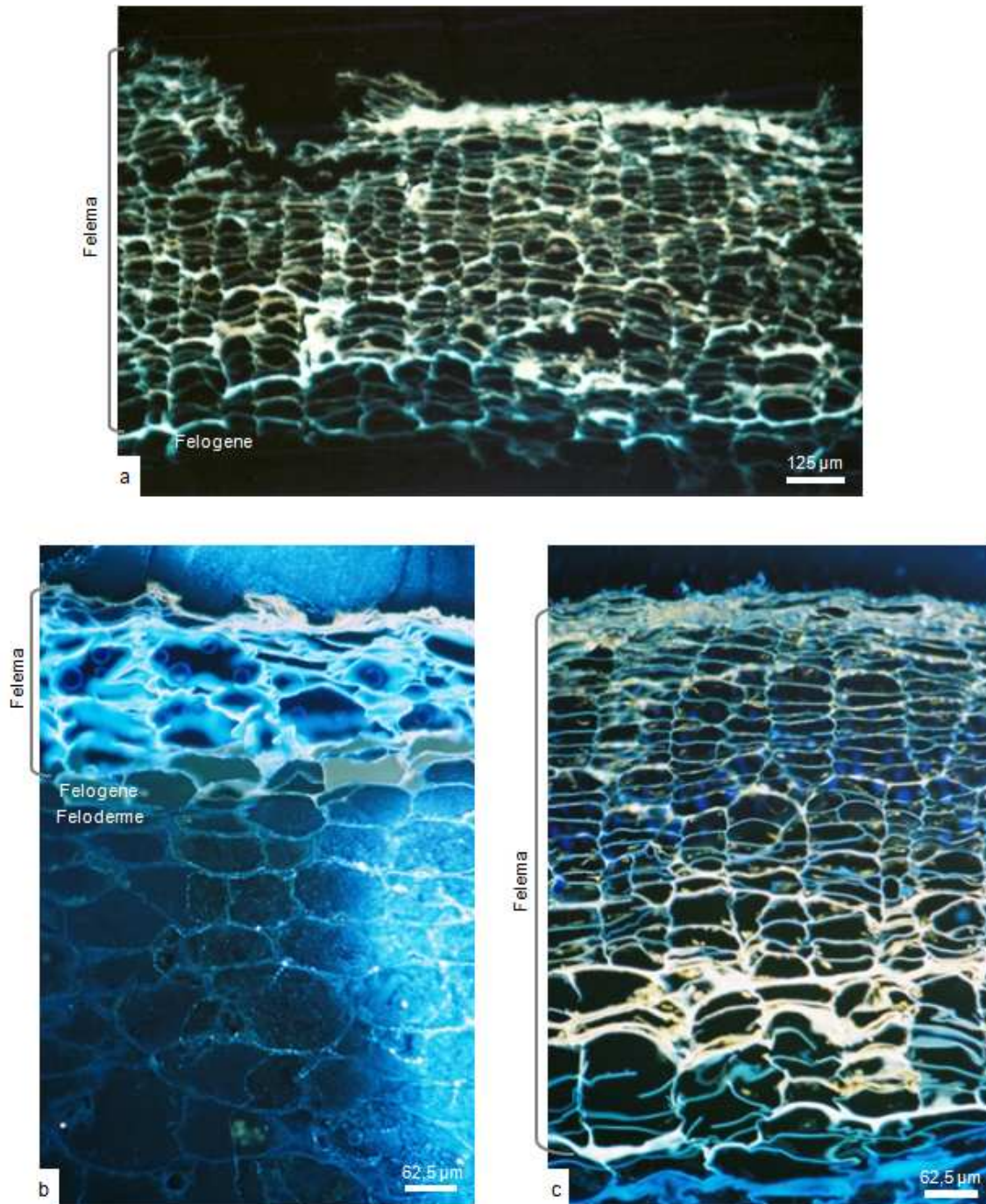


Figura 35 – Periderme das batatas mutantes *CYP86A33#3* (b) e *FHT#37* (a e c). (Luz fluorescente com Calcofluor (b e c) e sem corante (“autofluorescência”) (a))

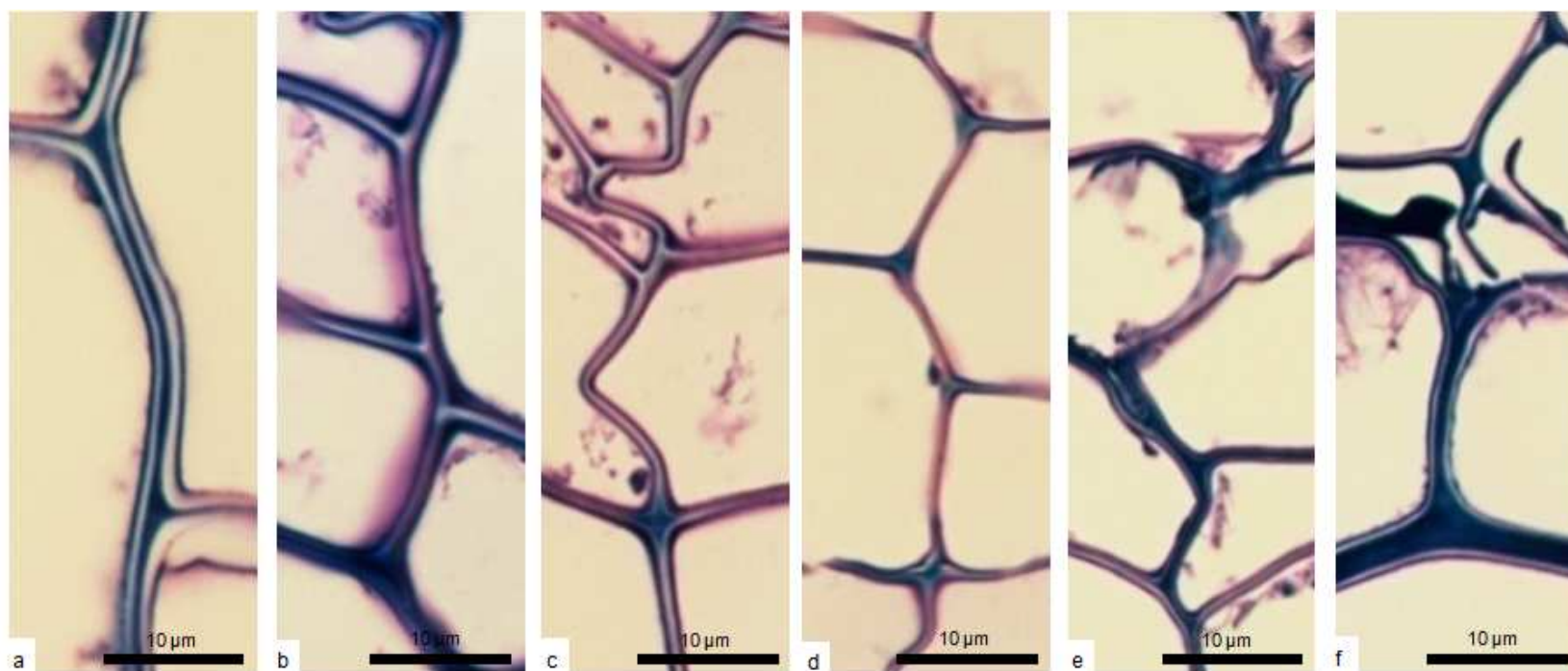


Figura 36 – Pormenor das paredes celulares da cortiça (a) e batatas (*Desirée* (b), *STKCS6#34* (c), *CYP86A33#3* (d) e, *FHT#37* (e e f). (Luz transmitida com Azul de toluidina O)

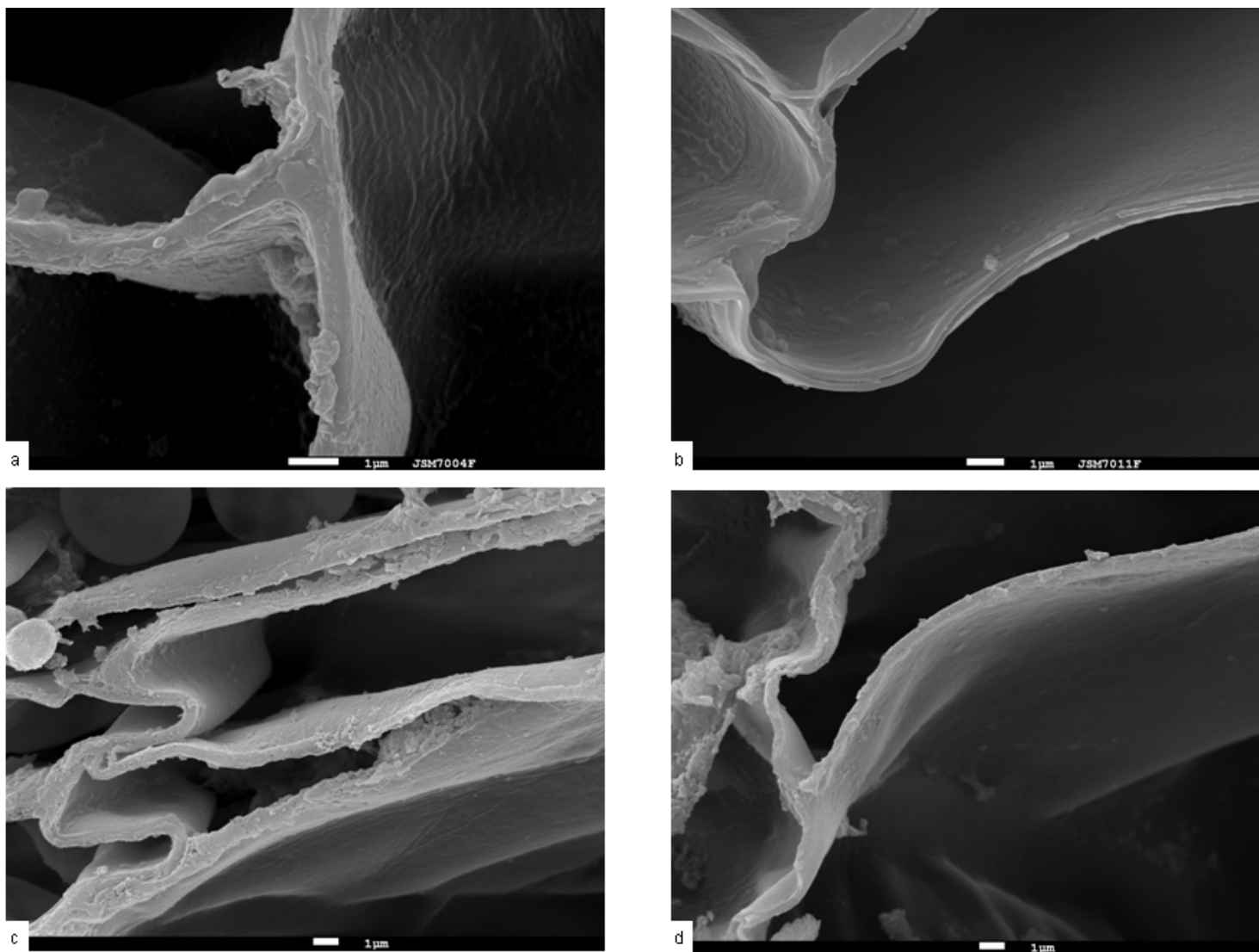


Figura 37 – Paredes celulares do felema das batatas. (Microscopia electrónica de varrimento - Desirée (a), *STKCS6#34* (b), *CYP86A33#3* (c) e, *FHT#37* (d))

## 4 Conclusão

Tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho pode concluir-se que, a felogene forma-se aproximadamente ao fim de poucas semanas de desenvolvimento dos caules jovens de sobreiro ou seja, a primeira periderme no sobreiro começa a formar-se quando a planta tem aproximadamente 1 mês de idade.

As peridermes do sobreiro e da batata são formadas por felema, felogene e feloderme, sendo facilmente identificáveis através do recurso a técnicas de microscopia de luz transmitida, luz fluorescente e luz polarizada com a utilização de corantes gerais e específicos para a suberina e celulose.

Em caules jovens de sobreiro a diferenciação da felogene ocorre na camada de células sub-epidérmica. Na fase inicial de actividade da felogene só há divisão para o exterior com produção de células de felema, sendo a “feloderme”, constituída por uma única fiada de células situadas mais interiormente, resultantes da divisão das células sub-epidérmicas originárias da felogene.

O processo de deposição da suberina e da formação da parede celular suberificada é rápido em caules jovens de sobreiro.

Através de técnicas de microscopia óptica e electrónica, foi possível também identificar e localizar as células suberificadas nas peridermes do sobreiro e da batata embora só no caso da cortiça fosse possível identificar as células em processo de diferenciação e suberificação das paredes celulares uma vez que nas amostras de batata utilizadas o processo de maturação já tinha terminado.

Conclui-se também que, o rasgamento e separação da cortiça amadia durante a extracção da cortiça dá-se ao nível da felogene e/ou das células que ainda se encontram numa fase muito inicial do seu processo de deposição da parede celular.

O processo de suberificação das paredes celulares das células de cortiça amadia de árvores em exploração, pressupõe diferentes fases de desenvolvimento, após a formação da célula por divisão da felogene. A célula-filha da felogene apenas com parede primária maioritariamente celulósica expande-se e só depois da felogene se tornar a dividir é que se dá a diferenciação celular através da deposição da parede secundária e da suberificação. Posteriormente a célula continua numa fase de ‘maturação’ da parede celular mantendo algum conteúdo citoplasmático e dando-se também a deposição da parede terciária. Só no fim deste processo é que a célula morre. Assim foi possível o reconhecimento na cortiça amadia de 3 zonas na fase de diferenciação celular/formação da parede celular suberificada: zona das células em divisão (núcleos proeminentes); zonas das células em formação/espessamento da parede e, zona das células em “maturação” da parede celular



(as paredes celulares têm a sua espessura e estrutura semelhante às das células maduras, mas as células ainda se apresentam cheias de conteúdo citoplasmático).

O processo de suberificação/formação da parede é rápido na cortiça amadia: células com a parede que aparenta estar completamente formada no que diz respeito à sua estrutura estão a poucas células de distância da felogene.

A análise da periderme de batatas cujos genes, presumivelmente envolvidos na síntese da suberina, foram alterados, em comparação com a periderme da batata de variedade Desirée, permitiu concluir que em termos anatômicos e provavelmente também a nível da constituição química das paredes celulares, as mutantes são diferentes da variedade Desirée.

Alterações nos genes que controlam a parte alifática da suberina, nas células suberificadas da periderme da batata, não parecem ter grandes efeitos estruturais nas paredes celulares; pelo contrário, o silenciamento dos genes que ligam a parte alifática à parte aromática parecem ter um efeito significativo na estrutura das paredes celulares suberificadas e também no número destas células formadas na periderme.

As células suberificadas da cortiça e da batata diferem em termos de espessura e organização dos constituintes das paredes celulares não tendo sido possível comparar as células em processo de suberificação das paredes celulares.

## 5 Referências bibliográficas

- Anderson, D. B. 1935. The structure of the walls of the higher plants. *Bot. Rev.* 1:52-76.
- Bernards, M. A., e Lewis, N. G.. 1998. The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: A hanging paradigm. *Phytochemistry* 47, 915-933.
- Brown, H. P.; Panshin, A. J. e Forsaith. 1949. *Textbook of wood technology*. Vol. I. MacGraw-Hill Book Co.. New York. 652 pp. Disponível em: <http://www.archive.org/stream/textbookofwoodte030324mbp#page/n9/mode/2up>. Acesso em: 18/07/2011
- Chan, L. 1986. The anatomy of the bark of *Agathis* in New Zealand. *IAWA Bull.* 7 (3): 229-241.
- Davidson, M.W. e Abramowitz, M. 1999. Optical microscopy. Disponível em: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/pdfs/microscopy.pdf>. Acesso em: 19/07/2011
- De Bary, A. 1884. *Comparative anatomy of the vegetative organs of phanerogams and ferns*. Oxford, Clarendon Press. 684 pp.
- Esau, K. 1953. *Plant Anatomy*. John Wiley & Sons, Inc. 735 pp.
- Esau, K. 1974. *Anatomia das plantas com sementes*. Editora Edgard Blucher L<sup>da</sup>. S. Paulo. Brasil. 293 pp.
- Evert, R. F. 2006. *Esau's Plant Anatomy – Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body – Their Structure, Function and Development*. 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-Interscience. New Jersey. 601 pp.
- Fahn, A. 1985. *Anatomia Vegetal*. Ediciones Pirâmide, S.A. Madrid. 643 pp.
- Fortes, M.A.; Rosa, M.E.; Pereira, H. 2004. *A Cortiça*. IST Press. Lisboa. 259 pp.
- Frey-Wyssling, A. 1976. *The plant cell wall*. Handbuch der Pflanzenanatomie, Band 3, Teil 4. Abt. Cytologie, 3<sup>rd</sup> rev. ed. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Graça, J. e Pereira, H. 1993. *Formação e desenvolvimento da primeira periderme no sobreiro. Relações com as características da cortiça amadia*. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. 28 pp.
- Graça, J. e Pereira, H. 2004. The periderm development in *Quercus suber*. *IAWA Bull.* 25(3): 325 – 335.
- Howard, E. T. 1977. Bark structure of the southern upland oaks. *Wood Science* 9 (3): 172-183.
- Kerr, T., e Bailey, I. W.. 1934. The cambium and its derivate tissues. X. Structure, optical properties and chemical composition of the so-called middle lamella. *Arnold Arboretum Jour.* 15:327-349.

- Krishnamurthy, K. V.. 1999. *Methods in Cell Wall Cytochemistry*. CRC Pres LLC. Florida. 318 pp.
- Lacey, J. A. 1989. *Light microscopy in biology – a practical approach*. IRL Press. Oxford. 329 pp.
- Lev-Yadun, S. e Aloni, R. 1990. Polar patterns of periderm ontogeny, their relationship to leaves and buds, and control of cork formation. *IAWA Bull.* 11(3): 289-300.
- Lulai E.C. e Freeman T.P. 2001. The importance of phellogen cells and their structural characteristics in susceptibility and resistance to excoriation in immature and mature potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) periderm. *Annals of Botany* 88. 555-561.
- Lyon, H. 1991. *Theory and Strategy in Histochemistry*. Springer-Verlag. Berlin. 591 pp.
- Marchi, E.C.S. e de Castro, D.M.. *Revisão de Microscopia – Disciplina DBI Anatomia vegetal*. Ministério da Educação e do Desporto. Universidade Federal de Lavras. Departamento de Agricultura. 2005. Disponível em: <http://www.scribd.com/doc/6729026/Microscopia-basica2>. Acesso em: 19/07/2011
- Moore, R.; Clark, W. e Ster, K. 1995. *Botany*. Brown Publishers. Dubuque. 823 pp.
- Natividade, J.V. 1938. O que é a cortiça. *Boletim da Junta Nacional da Cortiça* 1.
- Nikon. 1989. Fluorescence Microscopes.
- Pereira, H.; Rosa, M.E.; Fortes, M.A. 1987. The Cellular Structure of Cork from *Quercus suber* L. *IAWA bulletin* 8: 213 – 218.
- Raven, P.; Evert, R. e Eichhorn, S. 1999. *Biology of plants*. Freeman and Company. New York. 994 pp.
- Reeve R.M., Hautala E., Weaver M.L. 1969. Anatomy and compositional variation with potatoes. I. Developmental histology of the tuber. *American Potato Journal* 46: 361-373.
- Sabba, R. P. e Lulai, E. C.. 2002. Histological analysis of the maturation of native and wound periderm in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber. *Annals of Botany* 90: 1-10.
- Santos, T. 1998. *Variabilidade da estrutura anatômica da casca da Eucalyptus globulus Labill.* Dissertação de doutoramento. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. 224 pp.
- Serra, O; Soler, M.; Hohn, C.; Franke, R.; Schreiber, L.; Prat, S.; Molinas, M. e Figueras, M.. 2009. Silencing of *StKCS6* in potato periderme leads to reduced chain lengths of suberin and wax compounds and increased peridermal transpiration. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, Nº 2: 697-707.

- Serra, O; Soler, M.; Hohn, C.; Sauveplane, V.; Pinot, F.; Franke, R.; Schreiber, L.; Prat, S.; Molinas, M. e Figueras, M.. 2009a. *CYP86A33*-Targeted gene silencing in potato tuber alters suberin composition, distorts suberin lamellae, and impairs the periderm's water barrier function. *Plant Physiology*, Vol. 149: 1050-1060.
- Serra, O; Hohn, C.; Franke, R.; Prat, S.; Molinas, M. e Figueras, M.. 2010. A feuloyl transferase involved in the biosynthesis of suberin and suberin-associated wax is required for maturation and sealing properties of potato periderm. *The Plant Journal*, 62: 277-290.
- Sifton, H.B. 1945. Air-space tissue in plants. *Bot. Rev.* 11: 108-143.
- Steven, F. V. e Lulai, E. C.. 1991. Vaughn and Lulai: Suberin stains comparison of fluorescent stains for the detection of suberin in potato periderm. *American Potato Journal* vol. 68. Pages 667-674
- Teixeira, R. T. e Pereira, H.. 2010. Suberized cell walls of cork from cork oak differ from other species. *Microscopy and Microanalysis*, 16: 569-575.
- WIKIPÉDIA. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Batata>. Acesso em: 21/07/2011